

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Neukölln

Chefarzt u. Ärztl. Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

Die Wirkung der Ascorbinsäure auf die Proliferation von Knochenmark in Kulturen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Norbert Lutz Schmidt
aus Berlin

1967

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Neukölln

Chefarzt u. Ärztl. Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

Die Wirkung der Ascorbinsäure auf die Proliferation von Knochenmark in Kulturen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Norbert Lutz Schmidt
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. W i t t
Referent: Privatdozentin Dr. med. Irene B o l l
Korreferent: Professor Dr. med. Hans-Joachim D u l c e



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 5. Oktober 1967

In Dankbarkeit

meiner Mutter

gewidmet

G l i e d e r u n g

A Literaturüberblick

B Methode

C Ergebnisse

a) Reifungskurven

b) Mitose-Indices

c) karyologische Kurven

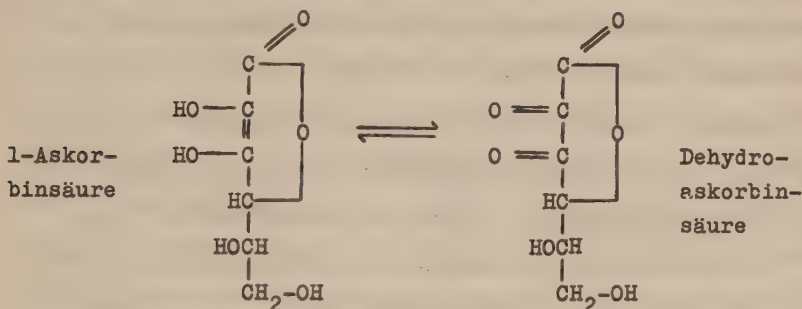
d) G/E-Index

D Diskussion

E Zusammenfassung

F Literaturverzeichnis

SZENT-GYÖRGYI gelang es 1927 aus der Nebennierenrinde des Rindes und aus Pflanzenmaterial eine kristallisierte Substanz zu isolieren, die er Hexuronsäure ($C_6H_8O_6$) nannte (63, 69). 1932 konnte er zeigen, daß dieser Stoff das reine antiskorbutische Vitamin-C ist und nannte ihn zusammen mit HAWORTH (63, 69) "Askorbinsäure".



(s. DEGKWITZ, SCHNEIDER, STAUDINGER (14)).

Die reduzierte Form des Vitamins ist eine relativ starke Säure (pK_a 4,17), während die oxydierte Form nicht ionisierbar ist und eine zehnmahl größere Lipoidlöslichkeit besitzt (23, 40). Die Verteilungskoeffizienten zwischen n-Butanol und Wasser sind bei pH 7,4 für Askorbinsäure = 0,01 und für Dehydroaskorbinsäure = 0,10 (40).

Nachdem Vitamin-C chemisch rein darstellbar war, wurde es auch bezüglich seiner Wirkung auf die Blutbildung untersucht. Bei der Durchsicht der Nachschlagewerke und Lehrbücher fällt auf, daß ein Einfluß von Vitamin-C auf die Hämatopoese oft angenommen, dieser aber selten in seinen Folgen präzisiert wird. Allgemein gehaltene Mitteilungen sind nicht selten: "Auf das Knochenmark wirkt Vitamin-C anregend, indem es die

Bildung und Reifung der roten Blutkörperchen fördert" (STANGL ⁽⁶²⁾) oder "Durch fortgesetzte Verabfolgung hoher Askorbinsäuredosen kann eine C-Hypervitaminose erzeugt werden, die sich in ...einer Knochenmarkreizung äußert" (KÜHNAU und HOLT ⁽³⁶⁾). Von STUDER, ZBINDEN und MEHLINGER ⁽⁶⁶⁾ wird bei Vitamin-C-Mangel eine Anämie und Leukopenie beschrieben, ohne mitzuteilen, ob es sich dabei um eine Neutrophilopenie oder Lymphopenie handelt.

Die spezielle Literatur bietet folgende Hinweise:

Unter Askorbinsäuremangel schwankt der Zellgehalt des menschlichen Knochenmarks in mäßigen Grenzen um die Norm ⁽⁶⁶⁾, wobei aber das Sternalmark in einzelnen Fällen außerordentlich fettreich gefunden werden kann ^(66, 73). Nach VILTER ⁽⁷³⁾ ist das blutbildende Knochenmark bei Vitamin-C-Mangel durch embryonales Stützgewebe und Fett verdrängt und es besteht eine verminderte Erythropoese, in der bei der Differenzierung die Normoblasten relativ vermehrt sein können. Er nimmt daher einen echten Mangel an Knochenmarktätigkeit an ⁽⁷³⁾. Neben Beispielen von hypoplastischem Mark ^(73, 75) sollen aber auch solche mit hyperplastischem vorkommen ^(30, 45). Die Erythrozytenvorstufen sind relativ vermehrt ⁽⁶⁶⁾, so daß Vitamin-C-Mangel als Ursache der Erythroblastose des Knochenmarkes genannt worden ist ⁽²⁰⁾.

Gelegentlich werden Megaloblasten gesehen ^(30, 44, 66, 73). Der Vitamin-C-Mangel soll sich störend auf den Folsäurestoffwechsel auswirken, indem der Citrovorumfaktor in ungenügender Menge bereitgestellt wird ⁽⁶²⁾. Nach neueren Untersuchungen an männlichen Ratten wird eine Vorstufe dieser

Substanz durch Vitamin-C geschützt, in dem ihre Inaktivierung durch Oxydation verhindert wird (15). Dieser Wirkungsmechanismus wird der Megaloblastenanämie bei Kindern und Schwangeren zugrunde gelegt (33, 42, 43).

MAY und Mitarb. (41, 54, 67) finden bei Vitamin-C und Folsäure verarmten Affen eine megaloblastäre Anämie, die jedoch erst dann auftritt, wenn das Vollbild des Skorbutus ausgebildet ist. Behandlung mit Folsäure oder Vitamin-C normalisiert das Knochenmark. Bei Meerschweinchen zeigt das Knochenmark während einer Vitamin-C-Mängeldiät nach 14-18 Tagen eine Abnahme der kernhaltigen roten Zellen, sowie eine Zunahme der Granulozytenvorstufen (52). Nach 21-25 Tagen sind höhere Prozentwerte Erythrozyten als bei den Kontrolltieren zu finden; die Granulozyten sind wieder niedriger. Einmalige Zufuhr von Ascorbinsäure erzeugt bei Tieren mit frischem Skorbut eine Normalisierung des Knochenmarks und eine starke periphere Eosinophilie.

PROEHL, MAY (54) und LEIBETSEDER (37) sowie PILLERO, GORDON (52) sind der Meinung, daß Vitamin-C in der Hämatopoese keine so spezielle Funktion ausübt, wie z.B. Folsäure oder Eisen. Es scheint immer nur eine zusätzliche Rolle zu spielen. Sein Mangel kann eine andere Mangelanämie verschlimmern oder auslösen.

Die Einflussung des peripheren Blutes durch Vitamin-C ist mannigfaltig:

Eine A n ä m i e kann beim Skorbut als gesichert angenommen werden (26, 30, 45, 50, 52, 66, 68, 75), obwohl sie STUDER (65) nur sehr unregelmäßig auftreten sieht und

BARTLEY, KREBS und O'BRIEN (4) überhaupt nicht. Diese Anämie wird nicht allein durch skorbutische Blutverluste hervorgerufen, sondern ist durch eine Beeinträchtigung der Knochenmarktätigkeit bedingt (26, 45, 50, 52). Die früher geschilderten Zusammenhänge zwischen Folsäure und Vitamin-C können eine makrozytäre Anämie beim Skorbut mit Kernreifungsstörung erklären (14, 33, 42, 43, 52, 56, 74). Eine hypochrome Anämie scheint mehr mit der Rolle des Vitamin-C im Eisenstoffwechsel zusammenzuhängen, wo es in die Resorption und Verwertung (Einbau in das Protoporphyrin) eingreift (14, 37, 56, 63, 66, 70, 74). Diese Anämie spricht auf Vitamin-C Medikation erst an, wenn gleichzeitig Eisen verabreicht wird (65).

Im Blut wird die Retikulozytenzahl schon eine Stunde nach der Gabe von 25 und 50 mg Vitamin-C beeinflusst (SEYDERHEIM und GREBE (61), GAUBATZ und DEBOBEN (19)). Dabei kann es sich lediglich um eine Ausschüttung startbereiter Zellen handeln. BARBIER (3) stellt so starke spontane Retikulozytenschwankungen im Blut fest, daß die Ausschüttung von Retikulozyten nach 1 g Askorbinsäure i.v. zwar vorhanden ist, aber nicht jenseits der Fehlergrenze liegt. Einen sofortigen Anstieg der Retikulozyten finden EULER und MALMBERG (17) beim skorbutischen Meerschweinchen nach Gabe von 100 mg Vitamin-C. Die Höhe des Anstiegs wechselt, erreicht teilweise 30 %, liegt durchschnittlich um 10 % (Der Normbereich liegt um 2 %). Eine Woche später werden wieder normale Werte gefunden. Beim normal gefütterten Tier ist kein wesentlicher Einfluß zu sehen.

Über die Beeinflussung des w e i ß e n B l u t b i l d e s durch Ascorbinsäure gibt es folgende Mitteilungen:

Bei gesunden Studenten untersucht NEANDER ⁽⁴⁸⁾ den speziellen Einfluß von Vitamin-C auf die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und stellt fest, daß er bei 18 Personen einen Anstieg der Granulozyten von ungefähr 42 % bei einem Plasmaspiegel von 0,14 - 0,28 mg% Ascorbinsäure auf 74,5 % bei einem Plasmaspiegel von 1,34 mg% erhält.

Nach 750 mg per os :

Zeit	Leukozyten/ mm ³	% Gran.	absolut Gran./mm ³
15 ³⁰	7300	52	3800
16 ³⁰	9600	58	5500
18 ⁰⁰	10600	68	7200
19 ⁰⁰	10800	66	7200

Fällt der Plasmaascorbinsäurespiegel, so fällt auch die Granulozytenzahl. Bei Gabe einer konstanten Dosis Vitamin-C besteht nach einigen Tagen ebenfalls eine geringe Tendenz zum Leukozytenabfall.

Wie lange der Anstieg nach einmaliger Vitamin-C-Gabe besteht, wird nicht untersucht. Die Vermehrung ist aber auch als Verteilungsänderung der Leukozyten im Blutstrom erklärbar.

MÜLLER ⁽⁴⁷⁾ erhält bei Gabe von 100 mg Redoxon ^R nach 15 und 30 Minuten einen Anstieg der Leukozyten. Bei langfristigen Untersuchungen hat fast in allen Fällen nach 250 oder 500 mg Ascorbinsäure täglich die Zahl der Leukozyten nach 5 Tagen fast das Doppelte des Ausgangswertes erreicht. Die Vermehrung wird hauptsächlich durch segmentkernige neutrophile

Granulozyten verursacht. Bei den kurzfristigen Versuchen sind die Neutrophilen um 20 %, die Eosinophilen um 100 % und die Lymphozyten um 10 % des Ausgangswertes vermehrt. SCHNETZ (57) kann sowohl unmittelbar nach 300 mg Vitamin-C i.v. als auch im Dauerversuch über mehrere Tage bei parenteraler Gabe (200-600-900 mg/die) zeigen, daß Vitamin-C -abhängig von der Ausgangslage- eine normalisierende Wirkung auf die Leukozytenzahl besitzt. Beim leukopenischen Blutbild (Grippe) wird die Erhöhung der Leukozyten beschleunigt, während bei der Leukozytose (Leukämische Myelose, Pneumonie) das Absinken beschleunigt wird. Bei gesunden Personen mit normalen Leukozytenzahlen wird keine oder nur eine leichte und flüchtige Erniedrigung wahrgenommen. SCHNETZ (57) führt die verschiedene Wirkung auf eine "möglicherweise allgemeine Mobilisierung der Abwehrkräfte des kranken Organismus" zurück. Demgegenüber berichten SCHNETZ und GREIF (58) von einer leukopenie erzeugenden Wirkung des Vitamin-C, ohne näher darauf einzugehen. Im Selbstversuch findet SCHADE (55) bei 10-tägiger Zufuhr von insgesamt 2 g Vitamin-C eine Granulozytopenie mit Eosinophilie und relativer Lymphozytose. Während der Versuchszeit wurde er einmal auf verschiedene Felder des Oberschenkels (4,5; 6; 7,5 und 9 Min. lang) höhensonnenbestrahlt. Eine Eosinophilie bei Ratten findet VANHA-PERTTULA (72) innerhalb von 96-120 Std. mit Maximum nach 48 Std. durch Einfluß von Vitamin-C. Auch nach GRAB (23) und MÜLLER (47) fördert die Ascorbinsäure die Bildung der Leukozyten und besonders die der Eosinophilen.

Einen geringen senkenden Einfluß auf hohe Lymphozytosen bemerkt HOFMEIER (29).

Bei der Vitamin-C Avitaminose wird vielfach eine Leukopenie gesehen (20, 25, 65, 66, 68), aber auch über Leukozytosen (46) wird berichtet; diese werden als verminderte Phagozytoseaktivität durch geringere Emigration in das Gewebe angesehen (66). BARTLEY, KREBS und O'BRIEN (4) finden bei 5 Versuchspersonen, die kein Vitamin-C während 14 Monaten erhielten, daß die Zahl der Leukozyten von $8050/\text{mm}^3$ zu Beginn des Experimentes auf $5300/\text{mm}^3$ im manifesten Skorbut gesunken ist. Im Differential-Blutbild finden sie keine Änderung. Skorbutdiät führt bei Meerschweinchen zu einer Leukopenie (17).

Mehrere Arbeiten berichten über den günstigen Erfolg von Vitamin-C-Behandlung bei der Leukopenie, die durch Röntgenstrahlen in therapeutischen Dosen entstanden waren (12, 31, 63). Vitamin-C soll sogar einen prophylaktischen Effekt in dieser Beziehung besitzen (12).

Über die Beeinflussung der B l u t p l ä t t c h e n ist folgendes bekannt:

Bei akuter essentieller Thrombopenie finden BÖGER und MARTIN (6) eine Normalisierung der Thrombozyten-Werte durch Dosen von Vitamin-C (200 mg). Es soll, wie auch STEPP (63) berichtet, einen günstigen Einfluß auf das Knochenmark im Sinne einer gesteigerten Thrombozytopoese bei Thrombopenie ausüben. Aber bei normalen Werten ist ein Ansteigen der Thrombozyten nur in geringem Maße zu erzielen. ANSTETT (2) bezweifelt die direkte Beeinflussung des Knochenmarkes und vermutet, daß es sich im wesentlichen um eine Ausschwemmung

von verwendungsbereiten Blutplättchen nach Gabe von Vitamin-C handelt. PAPAYANOPULOS und SCHRÖDER (49) finden zwar keine deutliche Reaktion nach 100-300 mg Ascorbinsäure i.v. täglich während mehrerer Tage, aber nach hohen Dosen von 500 mg/die bei einer Gesamtmenge von 3-6 g ziemlich regelmäßig eine Steigerung der Thrombozyten, die stets über die physiologische Schwankungsbreite hinausgeht. Nach einmaliger Injektion (500 mg) kommt es nach 15 Minuten zu vorübergehendem Anstieg, der nach 75 Minuten nicht mehr zu erkennen ist. Die Thrombozytose durch große Dosen Vitamin-C ist nach diesen Autoren und ebenso nach GRAFE (24) wahrscheinlich Ausdruck einer Reizung des blutbildenden Knochenmarkes. Dazu schreibt BÜRGER (11): "Auch die Thrombozyten vermehren sich nach Obst und Gemüse in frischem ungekochtem Zustand". Nach GRAB (23) fördert die Ascorbinsäure die Bildung der Thrombozyten, wobei die Zahl auf über 500000 ansteigen kann. Beim Skorbut wird über verminderte (65, 66), normale (66) und gesteigerte (66) Thrombozytenzahlen berichtet.

F r a g e s t e l l u n g

Da über die Wirkung des Vitamin-C auf die Blutzellzahlen keine eindeutigen Angaben vorliegen, aber Hinweise auf Beeinflussung der Vorstufen im Knochenmark, soll diese Arbeit Aufschluß über die direkte Beeinflussung des Knochenmarkes durch Vitamin-C geben. Das ist nur in vitro möglich, um evtl. Einflüsse über die Nebennierenrinde (23, 32, 35) oder andere Organe auszuschließen. Wie wir wissen, aktiviert die

Ascorbinsäure die Hydroxylierungsreaktionen an bestimmten Vorstufen von Hormonen der Nebennierenrinde und fördert dadurch ihre Neubildung (KERSTEN und Mitarb. (35)). Es ist noch nicht entschieden, ob beim Skorbut die Anämie, Leukopenie und Thrombopenie durch eine Vitamin-C bedingte Bremsung der Nebennierenrinde verursacht wird. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Untersuchungen nicht am Versuchstier, sondern an der Knochenmarkkultur durchgeführt.

Neben Kontrollen verwendeten wir einmal die Konzentration von 1 mg% Vitamin-C im Kulturmedium, die nach der Literatur (63) als "Gut" angesehene Sättigung und einmal 3 mg% Vitamin-C, die unter physiologischen Bedingungen gerade noch zu erreichen ist (STEPP, KÜHNAU, SCHROEDER (63)).

Es wurden die Reifung und Regeneration anhand von Reifungskurven der Kulturen bis 72 Stunden, von Mitose-Indices und von karyologischen Kurven (der Mitose-Phasenverteilung) beurteilt.

Zur Frage des Zusatzes von Vitamin-C sind folgende Mitteilungen von Interesse: Die Ascorbinsäure kann in der oxydierten (= Dehydroascorbinsäure) oder reduzierten Form vorliegen. In welcher der beiden sie bei in vitro Versuchen vorliegt, wird von den verschiedenen Autoren unterschiedlich beantwortet:

Van EEKELEN, EMMERIE, JOSEPHY und WOLFF (1933) (16) berichten über die schnelle Umwandlung der Ascorbinsäure in die reversibel oxydierte Form im menschlichen Blut in vitro. Auch durch intravenöse Gabe von "decitrated lemon juice" steigt bei Kaninchen die reversibel oxydierte Form mäßig an.

Entsprechend teilen GOLDMANN und BUSCHKE (1935) ⁽²²⁾ mit, daß nach i.v. Injektion von Ascorbinsäure diese im Blut zum größten Teil in wenigen Minuten rasch in die reversibel oxydierte Form umgewandelt wird. Auch GABBE (1934) ⁽¹⁸⁾ findet, daß Ascorbinsäure im Serum ausschließlich in der reversibel-oxydierten Form vorliegt.

Im Gegensatz dazu berichten PLAUT und BÜLOW (1935) ⁽⁵³⁾, daß Oxalatblut in vitro unter CO₂-Atmosphäre während 60 Minuten die Ascorbinsäure nicht zu oxydieren vermag, daß vielmehr die gesamte zugesetzte Ascorbinsäure noch im reduzierten Zustand vorliegt. In O₂-Atmosphäre finden sie einmal die gesamte Menge, einmal nur die Hälfte der zugesetzten Ascorbinsäure wieder, sehen aber nie die Vermehrung der oxydierten Form der Säure. Nach denselben Autoren wird auch in vivo die oral zugeführte Ascorbinsäure nicht oxydiert, eine Meinung, die im Gegensatz zu GRAB (1965) ⁽²³⁾ steht. Durch eine schnelle Blutpassage soll bei PLAUT und BÜLOW ⁽⁵³⁾ dieser Anteil abtransportiert werden und daher reduzierte Ascorbinsäure bei mäßiger Zufuhr im Blut nicht nachzuweisen sein. Daher liegt auch nach diesen die Hauptmenge der im Blut nachweisbaren Ascorbinsäure in der oxydierten Form vor. Dieser Anteil soll konstant sein und vom Vitamin-C-Stoffwechsel nicht erkennbar berührt werden. Arbeiten von BORSOOK und Mitarb. (1937) ⁽¹⁰⁾ stützen die Annahme, daß Ascorbinsäure nur sehr langsam im menschlichen Blut oxydiert wird, da nach 4 Stunden noch 3/4 der zugesetzten Menge in reduzierter Form vorliegt.

Neuere Untersuchungen berühren die Frage der oxydativen Umwandlung der Ascorbinsäure in vitro nicht mehr. Nach MARTIN (1961) ⁽⁴⁰⁾ ist Dehydroascorbinsäure allgemein die Transportform des Vitamins und wird als solche vom Gewebe aufgenommen. Durch die Angaben anderer Autoren (13, 28, 29, 39, 51) wird diese Vermutung gestützt, daß Dehydroascorbinsäure leichter in die Organe, auch in die Blutkörperchen, eindringt als Ascorbinsäure und dadurch, daß Dehydroascorbinsäure als nicht ionisierbare "Säure" eine größere Lipoidlöslichkeit besitzt. Die oxydative Umwandlung in vivo geht vorwiegend in den Nieren vor sich, da die Dehydroform in den Nierenvenen höher konzentriert ist, als in Venen anderer Organe (MARTIN (1961) ⁽⁴⁰⁾ und GRAB (1965) ⁽²³⁾). Auch STEWART und Mitarb. (1953) ⁽⁶⁴⁾ nehmen an, daß bei Menschen der Gehalt an Dehydroascorbinsäure im Plasma 20-30 % vom "Gesamtgehalt" der Ascorbinsäure beträgt. Nach dieser neueren Auffassung über die Transportform der Ascorbinsäure in vivo, die im Gegensatz zu PLAUT und BÜLOW ⁽⁵³⁾ steht, ist nach von EEKELEN und Mitarb. ⁽¹⁶⁾ am wahrscheinlichsten, daß das Blut die Ascorbinsäure auch in vitro schnell in die reversibel-oxydierte Form überführt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Oxydation von Ascorbinsäure in Gegenwart von Luftsauerstoff (28).

Bei unseren Kulturversuchen, bei denen das Medium zur Hälfte aus dem Blutplasma der betreffenden Patientinnen besteht, und der Einfluß von Sauerstoff nicht auszuschließen ist, kann man daher annehmen, daß Vitamin-C vorwiegend in der oxydierten Form vorliegt.

Über die in vivo Aufnahme von Vitamin-C in die Blutkörperchen gibt es keine unterschiedlichen Meinungen. Vitamin-C reichert sich stark in den Leukozyten an, in die Erythrozyten dringt es auch ein, wobei aber die Aufnahmeform hauptsächlich die Dehydroaskorbinsäure ist ⁽²³⁾. Anders sieht es für die in vitro Aufnahme aus; hier sind wieder widersprechende Aussagen gemacht worden.

HEINEMANN (1941) ⁽²⁷⁾ führt aus, daß die Erythrozyten in Gegenwart von O₂ Ascorbinsäure vor dem Zerfall bewahren soll, ohne sie selbst aufzunehmen, während die Leukozyten den Zerfall erhöhen und zwar kommt es nicht zur Oxydation in die Dehydroform, sondern zu einem weiteren irreversiblen Abbau.

KELLIE und ZILVA (1935) ⁽³⁴⁾ sind derselben Meinung, betonen jedoch, daß die Leukozyten weder einen fördernden noch hemmenden Effekt auf die katalytische Oxydation durch Eisen und Kupfer haben. Der Einfluß der Leukozyten wird von HEINEMANN (1941) ⁽²⁷⁾ nicht gesondert bestimmt, sondern durch die Differenz der Ergebnisse von Erythrozyten mit und ohne Leukozyten angenommen. Unter Stickstoffatmosphäre nehmen nicht die Erythrozyten, nur die Leukozyten Ascorbinsäure auf. LLOYD und SINCLAIR (1953) ⁽³⁹⁾ interpretieren diese Resultate auf andere Weise, indem die Gegenwart von Leukozyten die Umwandlung der Ascorbinsäure in ein Derivat verursacht, das dann in die Erythrozyten eindringen kann. Setzt LLOYD (1951) ⁽³⁸⁾ Ascorbinsäure zu defibriniertem menschlichen Blut zu, fällt unter Luftzutritt und 37° C die "totale" Ascorbinsäure im Serum, während sie in den Erythrozyten steigt, und zwar abhängig von der Zahl der vorhandenen Leukozyten. Er nimmt

folgendes Reaktionsschema an:

1. Ascorbinsäure wird zuerst von den Leukozyten aufgenommen, obgleich keine wesentliche Vermehrung von Ascorbinsäure in Leukozyten nachgewiesen werden konnte und zu Dehydroascorbinsäure oxydiert,
2. diese gelangt durch das Serum in die Erythrozyten,
3. hier erfolgt eine Reduktion zu Ascorbinsäure.

Der totale Ascorbinsäuregehalt wechselt dabei in den Leukozyten nur unerheblich. LLOYD und SINCLAIR ⁽³⁹⁾ führen (1953) zur Unterstützung ihrer These an, daß Dehydroascorbinsäure sehr schnell in die Erythrozyten eindringt, um in ihnen reduziert zu werden. Als Erklärung der Ergebnisse dieser beiden Arbeiten nehmen HENDRY, EASON und OVEN ⁽²⁸⁾ an, daß die Autoren wahrscheinlich durch die schnelle Oxydation von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure in Gegenwart von Luft-sauerstoff getäuscht wurden.

HENDRY, EASON und OVEN ⁽²⁸⁾ untersuchen (1964) noch einmal die Fragestellung für Leukozyten und stellen fest, daß Dehydroascorbinsäure von den Leukozyten schnell aufgenommen und dort zu Ascorbinsäure reduziert wird. Daneben kommt es während einiger Stunden zur langsamen Freilassung von Ascorbinsäure in das umgebende Medium. Ascorbinsäure hingegen wird von den Leukozyten innerhalb von 30 Minuten nicht aufgenommen, was durch differentialzentrifugieren von Leukozyten angereichertem Plasma mit physiologischen Salzlösungen festgestellt wird.

Über die Ascorbinsäure-Aufnahme der Erythrozyten allein geben GOLDEN und SARGENT (1952) ⁽²¹⁾ Auskunft; sie benutzen

heparinisiertes venöses Blut, zentrifugieren es und waschen es zweimal in Ringer-Locke-Lösung und danach einmal in Plasma- oder Ringer-Locke-Lösung. Ähnlich der HEINEMANN'SCHEN (27) Versuche (s.o.) können sie dabei keinen Beweis erbringen, daß Erythrozyten Ascorbinsäure bei einer Konzentration von 0 - 0,4 mg% im Medium aufnehmen oder abgeben. CHRISTINE und Mitarb. (1956) (13) bestätigen diese Mitteilungen, daß Ascorbinsäure sehr langsam in Erythrozyten, Dehydroascorbinsäure dagegen schnell eindringt, dort reduziert und danach wieder abgegeben wird, wie es schon LLOYD und SINCLAIR (39) festgestellt haben. Aus Dehydroascorbinsäure entsteht neben Ascorbinsäure auch 2,3-Diketo-Gulon-Säure (14). Auch SCHULTZE, STOTZ und KING (1937-38) (60) finden bei Meer-schweinchen-Erythrozyten eine Reduktion von hinzugefügter Dehydroascorbinsäure.

l-Dehydroascorbinsäure ist in vivo biologisch ebenso wirksam, wie l-Ascorbinsäure, sicherlich wegen des reversiblen Gleichgewichtes zwischen beiden Verbindungen (14). Für unsere Kulturversuche ist von besonderem Interesse, daß bei einer Verringerung von Ascorbinsäure in vivo die Konzentration im Plasma bereits abnimmt, wenn die Leukozyten noch den maximalen Gehalt besitzen; sie vermögen also die Ascorbinsäure gegen ein starkes Konzentrationsgefälle festzuhalten (76). Außerdem wird Dehydroascorbinsäure nach CHRISTINE und Mitarb. (13) und HENDRY, EASON und OVEN (28) als Ascorbinsäure solange wieder abgegeben, bis keine Dehydroascorbinsäure mehr vorhanden ist.

Nach diesen Ausführungen wird Dehydroaskorbinsäure auch in vitro in Erythrozyten und Leukozyten leicht aufgenommen, so daß man postulieren kann, daß sie ebenso von Knochenmarkszellen wie von anderen Gewebezellen in vitro aufgenommen wird.

M e t h o d e

Zur Überlebenshaltung von menschlichem Knochenmark benutzen wir die Carrel'sche Methode, modifiziert von ALBRECHT und BOLL (1, 9). Das Blutplasma des Patienten wird mit Corhormon und Hank'scher Lösung gut gemischt. Die Mischung muß 33 - 40 % Plasma enthalten, um zu gerinnen. Corhormon ist zu 10 - 30 % vorhanden. Jeweils ein Tropfen von diesem Medium wird auf Deckgläser aufgebracht und bildet ein Koagulum auf das ein Knochenmarkbröckel gesetzt, mit Serum bedeckt und mit einem hohlgeschliffenen Objektträger und Paraffin luftdicht verschlossen wird. Beim Ansetzen der Kulturen wird auf Sterilität geachtet. Diese Deckglaskulturen sind mit verschiedenen Zusätzen angelegt:

- a) Kontrollkulturen ohne Zusatz,
- b) mit 1 mg% Vitamin-C im Koagulum,
- c) mit 3 mg% Vitamin-C im Koagulum.

Da freie Ascorbinsäure ziemlich sauer reagiert, wie schon eingangs erwähnt wurde, ist sie als Salz zugesetzt. In unserem Fall handelt es sich um das Natriumaskorbat der Firma "Droben".

Bei 37° C im Brutschrank inkubiert, werden von den Kulturen nach 24, 48 und 72 Stunden je zwei Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet, mit May-Grünwald und Giemsa nach Pappenheim gefärbt. Außerdem ist jeweils ein Originalausstrich des Sternalpunktates angefertigt worden. Von dem besseren beider Ausstriche wurden mindestens 1000 Zellen in meanderförmiger Zählweise ausgewertet.

Die rote Reihe wird differenziert in :

Proerythroblasten,
basophile Erythroblasten,
polychromatische Erythroblasten,
oxyphile Erythroblasten,
reife Erythroblasten,

wobei die Proerythroblasten und alle Erythroblasten bis auf die reifen als teilungsfähig angesehen werden
und die weiße Reihe in :

Myeloblasten,
Promyelozyten,
neutrophile Myelozyten,
eosinophile Myelozyten,
basophile Myelozyten,
Metamyelozyten (neutrophile jugendliche Granulozyten),
neutrophile stabkernige Granulozyten,
neutrophile segmentkernige Granulozyten,
eosinophile segmentkernige Granulozyten,
basophile segmentkernige Granulozyten,

wobei Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten zu den teilungsfähigen Zellen gerechnet werden.

Die jüngste Zelle der Erythropoese ist der Proerythroblast (15-20 μ Durchmesser). Der runde Kern hat ein feinkörniges und dichtes Chromatinnetz. Er ist gleichmäßig von einem intensiv blauen schmalen Zytoplasmasaum umgeben, der oft an einer Stelle eine Aufhellungszone zeigt.

Der kleinere basophile Erythroblast (8-15 μ Durchmesser) besitzt eine grobschollige Kernstruktur, wobei oft ein radspeichenähnliches Bild entsteht und ein dunkelblaues Zytoplasma.

Der Kern des polychromatischen Erythroblasten (8-12 μ Durchmesser) ähnelt dem des basophilen Erythroblasten. Das Zytoplasma variiert nach der Reife und nimmt durch Hämoglobineinlagerung eine Mischung von rötlichen und blauen Farbtönen an.

Das Zytoplasma des oxyphilen Erythroblasten (7-10 μ Durchmesser) hat fast die Farbe der Erythrozyten. Die Kernstruktur ist verdichtet.

Der reife Erythroblast (7-10 μ Durchmesser) besitzt einen pyknotischen, meist exzentrisch gelegenen Kern, sein Zytoplasma entspricht dem oxyphilen oder polychromatischen Erythroblasten. In dieser Arbeit werden alle Zellen der roten Reihe, die einen pyknotischen, also nicht mehr teilungsfähigen Kern haben, zu den reifen Erythroblasten gerechnet, unabhängig von der Reife des Zytoplasmas.

Der Myeloblast (10-16 μ Durchmesser) ist die jüngste Zelle der Granulopoese. Der wegen seiner sehr dichten und feinmaschigen Chromatinstruktur verwaschen wirkende Kern wird von einem schmalen, hellbasophilen ungranulierten Zytoplasmasaum umgeben. 2-3 Nucleoli sind meist deutlich sichtbar.

Der Promyelozyt (16-27/ μ Durchmesser) fällt durch grobe, azurophile Granula auf und ist die größte Zelle der Granulopoese. Die Größenzunahme erfolgt hauptsächlich zugunsten des Zytoplasmas, das im Vergleich zum Myeloblasten weniger basophil wirkt. Der Kern ist häufig oval oder leicht eingebuchtet. Nucleoli sind nur selten vorhanden.

Bei dem neutrophilen Myelozyten (14-18/ μ Durchmesser) sind die Granula feiner geworden. Die Zelle ist wieder kleiner, das Zytoplasma und die Granula sind oxyphil geworden. Der oft eingebuchtete Kern hat ein dichtes Chromatingerüst. Nucleoli sind nicht mehr zu erkennen.

Der eosinophile und basophile Myelozyt (14-18/ μ Durchmesser) besitzt statt der neutrophilen eine eosinophile bzw. basophile Granula, die Kern und Plasma weitgehend überdecken.

Der Metamyelozyt (14-18/ μ Durchmesser) ist dem Myelozyten ähnlich, hat jedoch einen stärker eingebuchteten Kern mit scholliger Struktur.

Beim stabkernigen Granulozyten ist der Kern hufeisenförmig. Er kann bereits Einschnürungen besitzen, die Verbindungen sind jedoch noch breiter als $1/3$ des Kernes. Die Kernstruktur ist viel dichter als beim Metamyelozyten.

Der neutrophile segmentkernige Granulozyt (10-15/ μ Durchmesser) besitzt im Kern fadenförmige Einschnürungen, so daß meistens 3-4 Segmente entstehen.

Beim eosinophilen bzw. basophilen segmentkernigen Granulozyt (10-15/ μ Durchmesser) finden wir im allgemeinen nur zwei rundliche ovale Segmente, die von eosinophilen bzw. basophilen Granula bedeckt sind.

Neben der Differenzierung der einzelnen Zellformen wurde besonders Wert auf die Abgrenzung der verschiedenen Mitosephasen gelegt:

1. Prophase : Sie ist dadurch charakterisiert, daß keine Nucleoli und Kernmembran mehr vorhanden sind, festes Spirem.
2. Frühe Metaphase: Die Chromosomen sind über die ganze Zelle verteilt; lockeres Spirem.
3. Späte Metaphase: Die Chromosomen sind zur Äquatorialplatte bzw. zum Monaster angeordnet.
4. Anaphase : Es bestehen 2 Spindelplatten, in der noch runden oder ovalen Zelle: Diaster.
5. Telophase: Das Zellplasma ist eingeschnürt, die Chromosomen bilden noch ein lockeres Dispirem.
6. Rekonstruktionsphase: In den durch Zytoplasma-Teilung entstandenen beiden Zellen sind die Kerne noch nicht wieder rekonstruiert, festes Dispirem.

Aus den Zählungen wurden Reifungskurven, karyologische Kurven und Tabellen der Mitose-Indices getrennt für die Erythropoese und Granulopoese und das Verhältnis beider zueinander, der G/E-Index, aufgestellt. Die Reifungskurven geben die prozentuale Verteilung der Zellformen wieder, während die karyologischen Kurven die Mitosephasenverteilung darstellen. Die Mitose-Indices werden in Promille ausgedrückt. Der G/E-Index zeigt das relative Verhalten der Granulopoese zur Erythropoese.

In die Untersuchung wurden folgende Patienten aufgenommen:

Patientin Sch.A. (Fall I)

Einweisung: 1.6.1965

Diagnose: Morbus Biermer

Knochenmark-Diagnose: Megaloblastenmark

Therapie bis zur Sternalpunktion (3.6.1965) :

Mixt. peps. 3 x 1 Essl./die

Blutbild: (2.6.1965)

Erythrozyten	2.03 Mill.
Hb	8,9 g%
Hb _E	43,8 %
Leukozyten	6400/mm ³
Eos	2 %
Seg	41 %
Lymph	53 %
Mono	3 %
Atyp Mono	1 %
Thrombozyten	87000/mm ³

Patientin J.E. (Fall II)

Einweisung: 4.6.1965

Diagnose: Morbus Biermer

dekomp. Diabetes mellitus

Mastopathia fibrosa cystica der li. Mamma

Knochenmark-Diagnose: Megaloblastenmark

Therapie bis zur Sternalpunktion (9.6.1965) :

Diabetesbehandlung

Blutbild: (4.6.1965)

Erythrozyten	2,79 Mill.
Hb	9,3 g%
Hb _E	33,3 %
Leukozyten	5000/mm ³
Stab	3 %
Seg	44 %
Lymph	40 %
Mono	10 %
Atyp Mono	3 %
Thrombozyten	107000/mm ³

Patientin St.E. (Fall III)

Einweisung: 16.6.1965

Diagnose: Endogene z.T. reaktive Depression bei cerebraler Gefäßsklerose mit hypochondrischer Klagsamkeit. Die Patientin wurde mit einer Schlafmittelvergiftung (Phanodorm^R) eingeliefert. Die Knochenmarkpunktion wurde unter Plasmozytomverdacht durchgeführt.

Knochenmark-Diagnose: angeregte Granulopoese

Therapie bis zur Sternalpunktion (29.6.1965) :

Flüssigkeitszufuhr, Cardiacs, Purinkörper,
Antibiotika und hohe Dosen Analeptika

Blutbild: (18.6.1965)

Erythrozyten	5,4 Mill.
Hb	15,4 g%
Hb _E	29 11 .
Leukozyten	14300/mm ³
Seg	77 %
Lymph	13 %
Mono	8 %
Atyp Mono	2 %

Patientin Sch.K. (Fall IV)

Einweisung: 21.7.1965

Diagnose: Verdacht einer Apoplexie, hypochrome Anämie,
Herzmuskelschaden

Knochenmark-Diagnose: verminderte Erythropoese und starke
Eisenbereitstellung im Retikulum sprechen für
eine Einbaustörung, aber es liegt nach der Ber-
liner Blau Reaktion keine sog. sideroachrestische Anämie vor.

Therapie bis zur Sternalpunktion (10.8.1965) : Lanicor
Mixt. peps. 3 x 1 Eßl./die (30.7. Beginn)
Plastulen 3 x 1 Tabl./die (25.7. bis 3.8.)
Ferrlecit 8 mg/die (3. bis 10.8.)

Blutbild:	<u>21.7.</u>	<u>11.8.</u>
Erythrozyten	2,77 Mill.	4,46 Mill.
Hb	7,3 g%	13,7 g%
Hb _E	27 11	30 11
Leukozyten	12000/mm ³	13400/mm ³
Eos	4 %	
Meta	1 %	
Stab	4 %	
Seg	67 %	
Lymph	19 %	
Mono	3 %	
Atyp Mono	2 %	
Thrombozyten	232.000/mm ³	

Der Anämie ist möglicherweise eine intestinale Blutung,
vielleicht aus Hämorrhoiden, vorausgegangen.

Patient L.P. (Fall V)

Einweisung: 27.6.1965

Diagnose: chron. lymph. Leukämie
essentieller Hochdruck

Knochenmark-Diagnose: chron. lymph. Leukämie

Therapie bis zur Sternalpunktion (29.6.1965) :

Sedaraupin 0,5 mg Tabl./die

Blutbild:

Erythrozyten	5,3 Mill.
Hb	15,4 g%
Hb _E	30,5 %
Leukozyten	37200/mm ³
Bas	2 %
Eos	1 %
Stab	3 %
Seg	21 %
Lymph	65 %
Mono	1 %
Atyp Mono	7 %

Insgesamt wurden aus den Knochenmark-Kulturen 40.000 Zellen differenziert. Für unsere Versuchsreihe wurden nur die Kulturen der ersten 4 Patientinnen ausgewertet. Das Knochenmark des 5. Patienten konnte nicht verwendet werden, da in jedem Präparat bei 1000 ausgezählten Zellen wegen des hohen Lymphozyten-Anteils zu geringe Zellzahlen für die erythropoetische und myeloische Reihe vorhanden waren.

Bei der zeichnerischen Darstellung wurden folgende Abkürzungen verwendet: für die

Granulopoese: MB = Myeloblasten

P = Promyelozyten

NM = neutrophile Myelozyten

EM = eosinophile Myelozyten

J = neutrophile jugendliche Granulozyten
(Metamyelozyten)

St = neutrophile stabkernige Granulozyten

NS = neutrophile segmentkernige Granulozyten

ES = eosinophile segmentkernige Granulozyten

Erythropoese: PE = Proerythroblasten

bE = basophile Erythroblasten

pE = polychromatische Erythroblasten

oE = oxyphile Erythroblasten

rE = reife Erythroblasten

Ferner gelten folgende Kennzeichen:

————— Kontrollkulturen

— — — — — Kulturen mit 1 mg% Vitamin-C-Zusatz

----- Kulturen mit 3 mg% Vitamin-C-Zusatz

Abb. 1 PE

bE

pE oE rE 100 %

Fall I

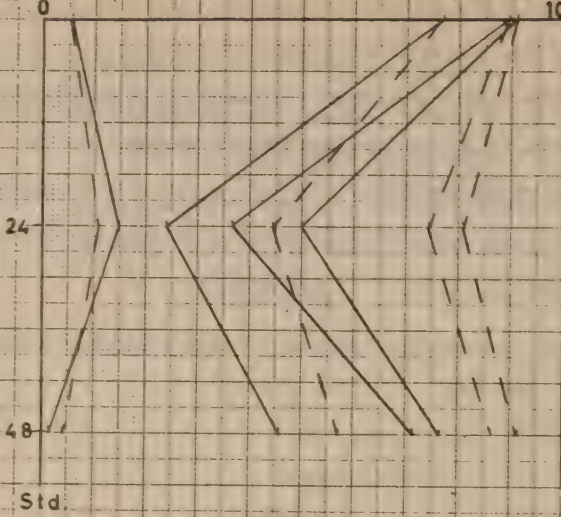


Abb. 2 PE

bE

pE oE rE 100 %

Fall I

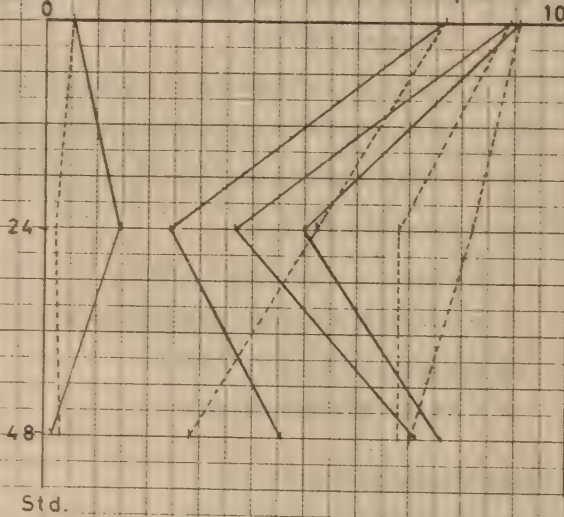


Abb. 3

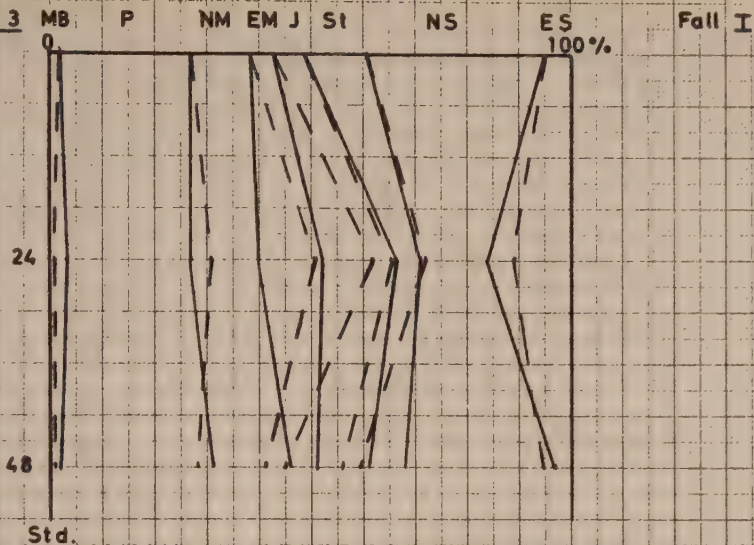


Abb. 4

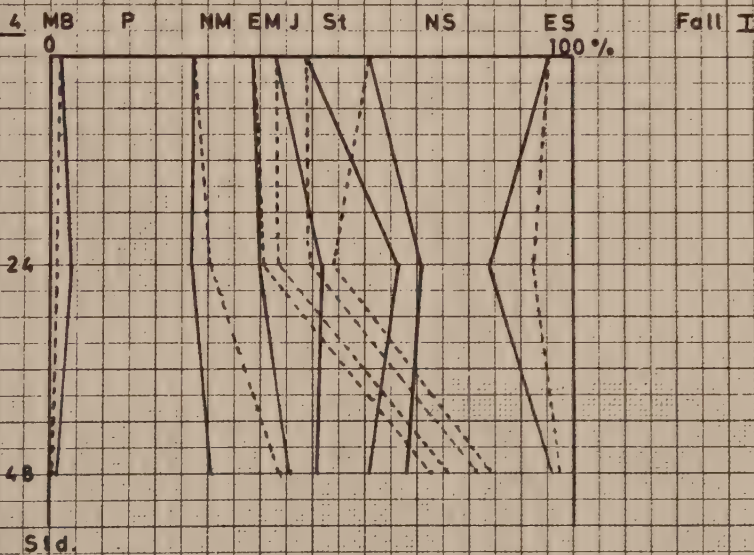
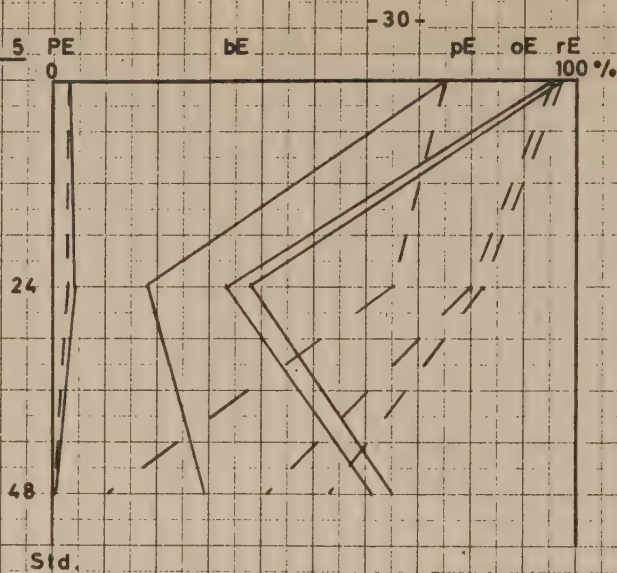
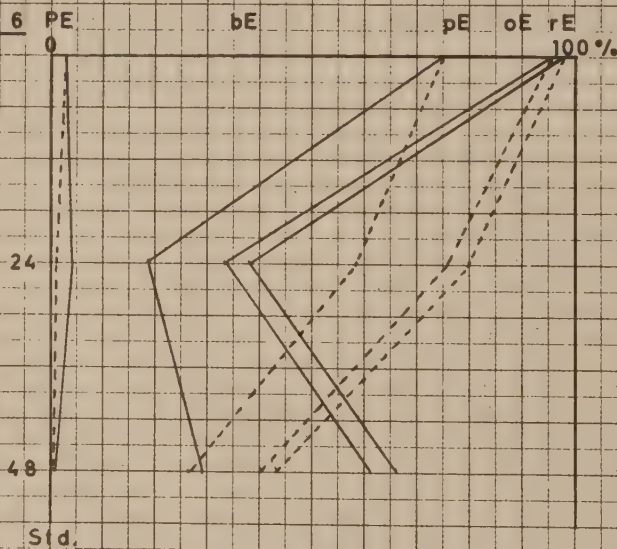


Abb. 5



Fall II

Abb. 6



Fall II

Abb. 7 MB

P

NM EM J St

NS

ES
100%

Fall II

24

48

Std.

Abb. 8 MB

P

NM EM J St

NS

ES
100%

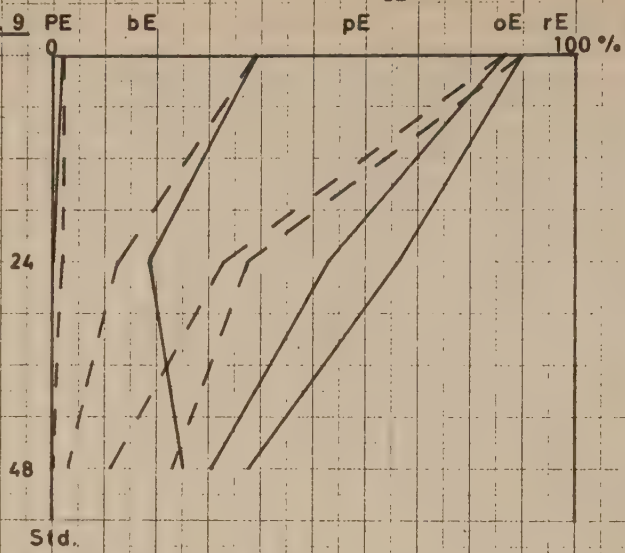
Fall II

24

48

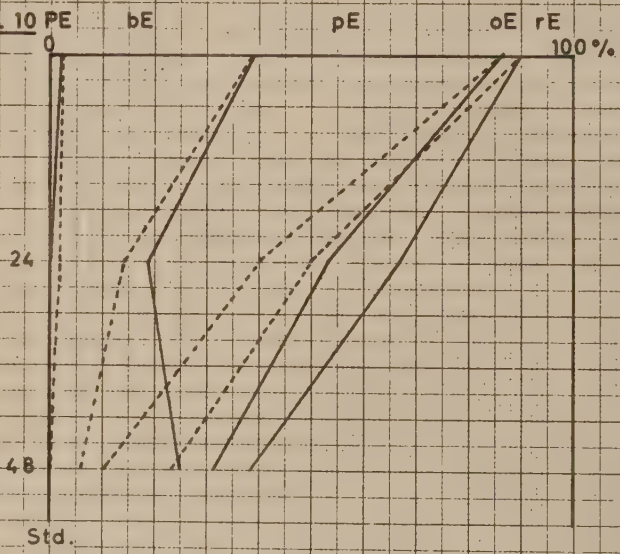
Std.

Abb. 9



Fall III

Abb. 10



Fall III

Abb. 11

MB

P

NMEM

J

St

NS

ES
100 %

Fall III

-33-

24

48

Std.

Abb. 12

MB

P

NMEM

J

St

NS

ES
100 %

Fall III

24

48

Std.

Abb. 13.

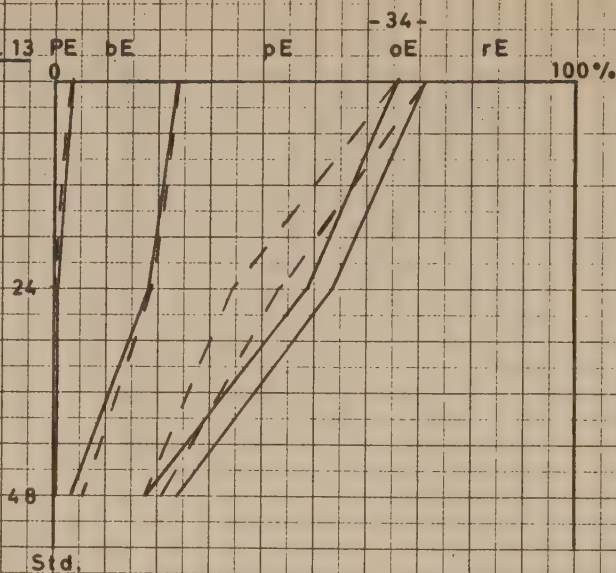


Abb. 14

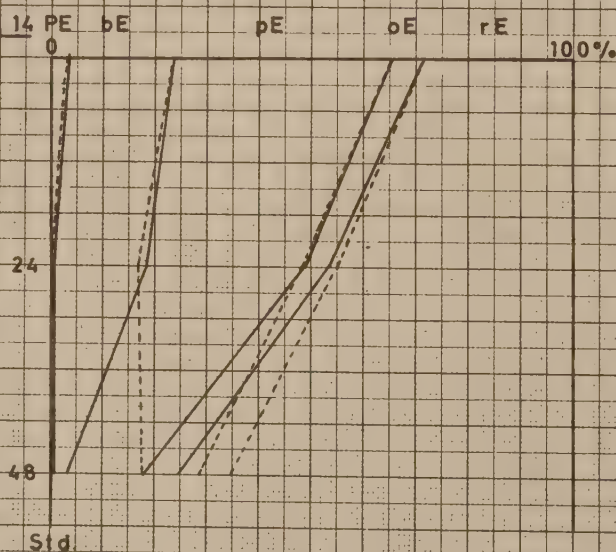


Abb. 15

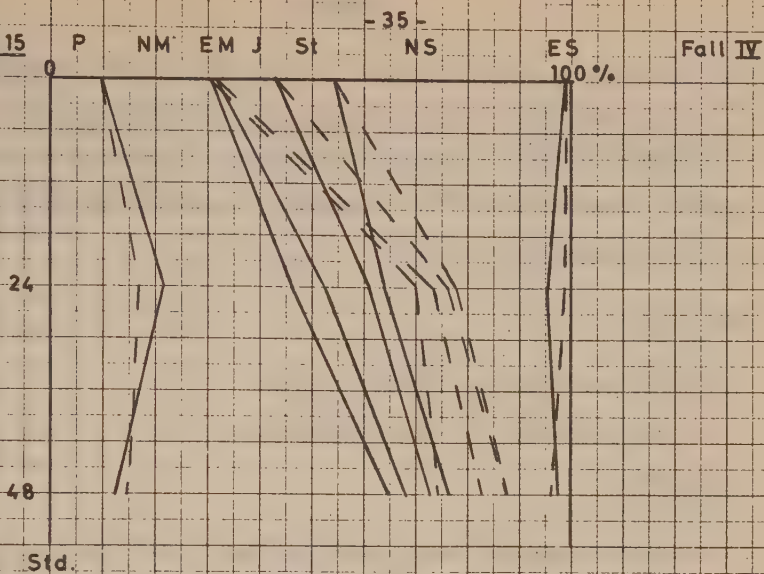
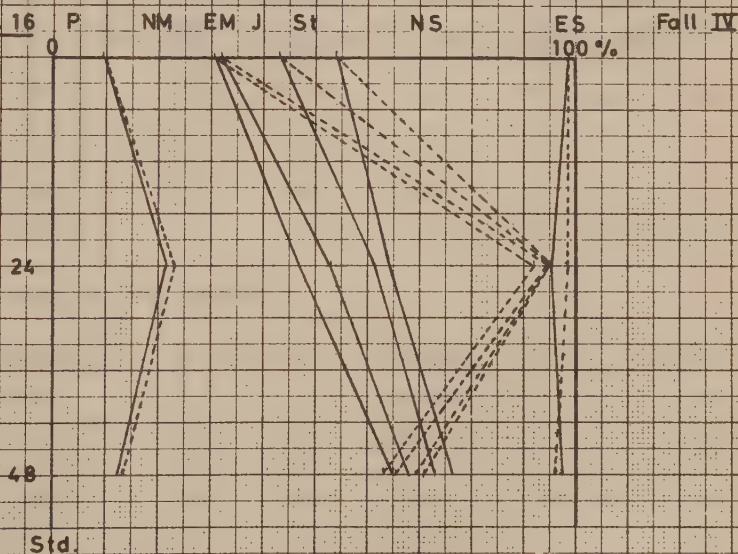


Abb. 16



Die Signifikanz wurde mit dem χ^2 Test nach HELMERT PEARSON (77) bestimmt. Für die weiße Reihe mit 8 differenzierten Zellformen war die Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % bei $\chi^2 = 18$ gegeben; in der roten Reihe mit 5 Zellformen bei $\chi^2 = 13$.

Dabei sind:

a = Zellzahl in den Zusatzkulturen

b = Zellzahl in den Kontrollkulturen

$$m = \frac{a + b}{2}$$

Bei zu großen Differenzen in den Summen von a und b wurde der Faktor $\frac{a}{a + b}$ bestimmt, der dann mit der Summe der einzelnen Zellformen multipliziert wurde.

Dieser Faktor steht in Klammern hinter "m" .

$$\Delta = a - m$$

Tabelle A

Patientin Sch.A. (I) -1 mg% nach 48 Std.- Megalogramulopoese

Zelltyp	a	b	m (0,45)	Δ	Δ^2/m
MB	4	8	5	1	0,20
P	124	166	131	7	0,38
NM	58	110	76	18	4,26
EM	17	25	24	7	2,04
J	48	59	48	0	0,00
St	16	36	23	7	2,13
NS	163	142	137	26	4,93
ES	22	7	13	9	<u>6,25</u>

$$\chi^2 = 20,19$$

Patientin J.E. (II) -1 mg% nach 48 Std.- Megalogramulopoese

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
MB	0	2	1	1	1,00
P	50	94	72	22	6,72
NM	158	315	237	79	26,33
EM	9	30	20	11	6,05
J	59	60	60	1	0,01
St	6	9	8	2	0,50
NS	276	146	211	65	20,02
ES	11	8	10	1	<u>0,10</u>

$$\chi^2 = 60,73$$

Beide Patientinnen zusammen:

Zelltyp	a	b	m (0,45)	Δ	Δ^2/m
MB	4	10	6	2	0,66
P	174	260	205	31	4,68
NM	216	425	288	72	18,00
EM	26	55	36	10	2,77
J	107	119	101	6	0,35
St	22	45	30	12	4,80
NS	439	288	327	112	38,36
ES	33	15	21	12	<u>6,85</u>

$$\chi^2 = 76,47$$

Tabelle B

Patientin Sch.A. (I) - Megalopoese

1 mg% nach 24 Std.

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
PE	58	78	68	10	1,47
bE	187	46	117	70	41,88
pE	168	62	115	53	24,42
oE	37	72	55	18	5,89
rE	104	265	185	81	<u>35,52</u>
					$\chi^2 = 109,18$

3 mg% nach 24 Std.

PE	13	78	46	33	23,67
bE	229	46	138	184	245,33
pE	71	62	67	4	0,23
oE	65	72	69	4	0,23
rE	82	265	174	92	<u>48,64</u>
					$\chi^2 = 318,10$

1 mg% nach 48 Std.

(0,54)					
PE	20	7	16	4	1,00
bE	251	175	230	21	1,91
pE	139	104	131	8	0,48
oE	27	21	26	1	0,03
rE	34	93	69	35	<u>17,75</u>
					$\chi^2 = 21,17$

3 mg% nach 48 Std.

(0,58)					
PE	19	7	15	4	1,06
bE	140	175	245	105	45,00
pE	229	104	197	32	5,19
oE	11	21	19	8	3,36
rE	169	93	155	14	<u>1,26</u>
					$\chi^2 = 55,87$

Patientin J.E. (II) - Megalopoese

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
1 mg% nach 24 Std.			(0,59)		
PE	11	11	13	2	0,30
bE	283	46	194	89	41,34
pE	60	45	62	2	0,06
oE	12	11	14	2	0,28
rE	78	190	159	81	<u>41,26</u>
					$\chi^2 = 83,24$

3 mg% nach 24 Std.			(0,62)		
PE	6	11	11	5	2,27
bE	268	46	195	73	27,32
pE	92	45	85	7	0,57
oE	26	11	23	3	0,39
rE	106	190	174	68	<u>26,57</u>
					$\chi^2 = 57,12$

1 mg% nach 48 Std.			(0,53)		
PE	0	2	1	1	1,00
bE	35	86	61	26	11,11
pE	107	94	101	6	0,35
oE	40	12	26	14	7,53
rE	151	102	127	24	<u>4,53</u>
					$\chi^2 = 24,52$

3 mg% nach 48 Std.			(0,25)		
PE	0	2	0,5	0,5	0,05
bE	26	86	28	2	0,14
pE	13	94	27	14	7,51
oE	3	12	4	1	0,25
rE	55	102	39	16	<u>6,58</u>
					$\chi^2 = 14,53$

Beide Patientinnen zusammen:

	Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
1 mg% nach 24 Std.					(0,55)	
	PE	69	89	87	18	3,72
	bE	470	92	309	161	83,88
	pE	228	97	179	49	1,34
	oE	49	83	73	24	7,89
	rE	182	455	350	168	<u>8,06</u>
						$\chi^2 = 104,89$

3 mg% nach 24 Std.					(0,54)	
	PE	19	89	58	37	23,60
	bE	497	92	318	179	100,75
	pE	163	97	140	23	3,07
	oE	91	83	94	3	0,09
	rE	188	455	336	148	<u>68,16</u>
						$\chi^2 = 195,67$

Tabelle C

Patientin St.E. (III) - Granulopoese

1 mg% nach 24 Std.

Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
MB	5	3	4	1	0,25
P	250	174	212	38	7,17
NM	129	128	129	0	0,00
EM	33	46	40	7	1,22
J	45	30	38	7	1,28
St	10	24	17	7	2,88
NS	46	125	91	45	22,25
ES	9	16	13	4	1,23
					$\chi^2 = 36,28$

Patientin Sch.K. (IV) - Granulopoese

1 mg% nach 24 Std.

Zelltyp	a	b	m ^(0,46)	Δ	Δ^2/m
MB	9	3	6	3	1,50
P	68	107	81	13	2,08
NM	228	130	165	63	24,05
EM	13	28	18	5	1,38
J	14	46	28	14	7,00
St	6	13	9	3	1,00
NS	91	156	114	23	4,64
ES	5	20	12	7	4,08
					$\chi^2 = 45,73$

Tabelle D

Patientin St.E. (III) - Erythropoese

	Zelltyp	a	b	m	Δ	Δ^2/m
1 mg% nach 24 Std.					(0,45)	
	PE	3	1	2	1	0,50
	bE	27	55	37	10	2,70
	pE	51	103	69	18	4,69
	oE	13	43	25	12	5,76
	rE	160	102	118	42	<u>14,94</u>
					$\chi^2 =$	28,59

Patientin Sch.K. (IV)

1 mg% nach 24 Std.						
	PE	3	2	3	0	0,00
	bE	76	77	77	1	0,01
	pE	67	132	100	33	10,89
	oE	37	14	26	11	4,65
	rE	243	205	224	19	<u>1,61</u>
					$\chi^2 =$	17,16

Beide Patientinnen zusammen:

	PE	6	3	5	1	0,20
	bE	103	132	118	15	1,09
	pE	118	235	177	59	19,66
	oE	50	57	54	4	0,29
	rE	403	307	355	48	<u>6,49</u>
					$\chi^2 =$	27,73

E r g e b n i s s e

Die Reifungskurven der Knochenmarkkulturen von den beiden perniziösen Anämien, Patientin Sch.A. (Fall I) und Patientin J.E. (Fall II) (Abb. 1-8), zeigen bis 48 Stunden in vitro folgendes:

(Die 72-Stunden-Ausstriche konnten nur einmal verwertet werden, weil durch weitgehende Zelldegeneration keine 1000 Zellen zu bestimmen waren.)

Megalogranulopoese:

Gegenüber dem Originalausstrich findet sich in den Kontrollserien nach 24 Stunden im wesentlichen eine Verminderung der neutrophilen-segmentkernigen Granulozyten.

Nach 48 Stunden haben sich die Segmentkernigen nicht weiter vermindert. Während bei Fall I Promyelozyten und Myelozyten anteilmäßig fast unverändert geblieben sind, haben sich bei Fall II zu diesem Zeitpunkt auch die Promyelozyten vermindert, so daß die Myelozyten stark vermehrt sind.

Bei der Zusatzkonzentration von 1 mg% Vitamin-C sind nach 24 Stunden im Fall II die Myelozyten stark vermehrt. Die in den Kontrollen beobachtete Verminderung der Segmentkernigen ist unverändert. Nach 48 Stunden sind gegenüber den Kontrollen die Myelozyten vermindert und die Segmentkernigen vermehrt. Diese Veränderungen der Versuchskulturen gegenüber den Kontrollen nach 48 Stunden beeinflussen den signifikanten χ^2 -Wert am stärksten und finden sich

sowohl bei beiden Patientinnen allein, als auch bei der gemeinsamen Errechnung (Tab. A).

Die Zusatzkonzentration von 3 mg% Vitamin-C wirkt auf das megalogranulopoetische Knochenmark uneinheitlich: Fall I reagiert nach 24 Stunden gegenüber den Kontrollen mit einer Vermehrung der Segmentkernigen, während bei dem Fall II ebenso wie bei 1 mg% Vitamin-C die Myelozyten vermehrt sind. Nach 48 Stunden sind für die Zusatzkonzentration von 3 mg% Vitamin-C bei Fall I die Segmentkernigen etwas vermindert und bei Fall II keine Veränderungen gegenüber den Kontrollkulturen zu finden.

Megalopoesis:

Gegenüber dem Originalausstrich findet sich bei den Kontrollkulturen nach 24 Stunden eine starke Verminderung der basophilen und starke Vermehrung der reifen Megaloblasten. Nach 48 Stunden sind die basophilen und polychromatischen Anteile wieder relativ vermehrt.

Bei beiden Ascorbinsäure-Zusatzkonzentrationen finden die nach 24 Stunden in den Kontrollen beobachteten Veränderungen kaum statt. Sie verursachten am stärksten die Signifikanz des χ^2 -Wertes (Tab. B). Nach 48 Stunden sind die Reaktionen bei den beiden Patientinnen unterschiedlich ausgeprägt: Bei Fall I bewirkt 1 mg% Vitamin-C keine starke Abweichung der Kurven von den Kontrollen, während bei 3 mg% Vitamin-C die Signifikanz durch Verminderung der basophilen bei Vermehrung der polychromatischen Megaloblasten eingetreten ist. Bei Fall II bewirken beide Konzentrationen eine stärkere Verminderung der basophilen

und Vermehrung der reifen Megaloblasten. Die Veränderung ist aber nur bei 1 mg% Vitamin-C deutlich signifikant; bei 3 mg% Vitamin-C sind die Zellzahlen zu gering (Tab. B).

Die Reifungskurven der beiden Patientinnen mit Normopoesen St.E. (Fall III) und Sch.K. (Fall IV) (Abb. 9-16) bis 48 Stunden in vitro zeigen folgendes:

Granulopoese:

Gegenüber dem Originalausstrich findet sich bei den Kontrollkulturen nach 24 Stunden eine geringe Vermehrung der Promyelozyten und auch Myelozyten bei ebenfalls geringerer Verminderung der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten. Nach 48 Stunden ergeben sich mit Ausnahme der Myelozytenvermehrung bei Fall IV keine weiteren Veränderungen.

Bei der Zusatzkonzentration von 1 mg% Vitamin-C nach 24 Stunden sind bei Fall III die Promyelozyten gegenüber den Kontrollen vermehrt und die Segmentkernigen vermindert, während bei Fall IV die Vermehrung die Myelozyten betrifft. Diese Veränderungen verursachen eine sehr starke Signifikanz (Tab. C). Nach 48 Stunden finden wir durch 1 mg% Vitamin-C bei Fall III eine rückläufige Bewegung mit Angleichung an die Werte der Kontrollen, während bei Fall IV die Myelozyten gegenüber den Kontrollen vermehrt bleiben. Die Signifikanzberechnung wurde nicht angefügt, da, wie erwartet, keine Veränderungen zu errechnen waren.

Der Zusatz von 3 mg% Vitamin-C ist bei der Granulopoese nicht auszuwerten, da gegensinnige Reaktionen zu finden sind: bei der angeregten Granulopoese nach 24 Stunden eine Verminderung der teilungsfähigen Granuloblasten, bei der aplastischen Störung eine Vermehrung.

Erythropoese:

Gegenüber dem Originalausstrich findet sich bei den Kontrollkulturen nach 24 Stunden eine relativ gleichmäßige Verminderung der basophilen und polychromatischen Erythroblasten bei unwesentlicher Veränderung der oxyphilen und Vermehrung der reifen Erythroblasten. Nach 48 Stunden haben diese Veränderungen weiter zugenommen.

Bei der Zusatzkonzentration von 1 mg% Vitamin-C sind nach 24 Stunden gegenüber den Kontrollen die polychromatischen Erythroblasten vermindert und die reifen vermehrt. Diese Veränderungen sind die mit am stärksten beeinflussenden Werte des signifikanten χ^2 -Wertes (Tab. D). Nach 48 Stunden hat Fall III mit einer Vermehrung der oxyphilen Erythroblasten reagiert, während Fall IV den Kontrollwerten angeglichen ist.

Bei der Zusatzkonzentration von 3 mg% Vitamin-C findet sich nach 24 Stunden eine nur unwesentliche Veränderung gegenüber den Kontrollen. Nach 48 Stunden ist bei Fall III eine stärkere Vermehrung der reifen Erythroblasten im Vergleich zu den Kontrollen eingetreten, während bei Fall IV diese etwas vermindert ist.

Die Veränderungen geben bei 1 mg% Vitamin-C-Zusatz nach 48 Stunden und bei 3 mg% Vitamin-C-Zusatz zu beiden Zeiten wegen der zu kleinen Zahlen nach dem χ^2 -Test keine Signifikanz, weswegen die Berechnungen nicht angeführt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Reifungskurven in vitro:

1. Beide Konzentrationen von Vitamin-C hemmen die Vermehrung reifer Megaloblasten nach 24 Stunden in vitro.
2. 1 mg% Vitamin-C fördert in der Megalogramulopoese die Vermehrung der Segmentkernigen nach 48 Stunden in vitro signifikant und regt bei der normalen Granulopoese die Vermehrung der Granuloblasten nach 24 Stunden signifikant an. Weiterhin bewirkt 1 mg% Vitamin-C nach 24 Stunden eine signifikante Vermehrung der reifen normalen Erythroblasten.
3. 3 mg% Vitamin-C hat keinen signifikanten Einfluß auf die Reifung der Megalogramulopoese, auf die normale Granulopoese unterschiedliche Effekte. Es zeigt keinen deutlichen Einfluß auf die normale Erythropoese.

Betrachten wir die gefundenen Mitose-Indices (Tab. E), so liegen in der Granulopoese aller vier Fälle die Werte der beiden Zusatzkonzentrationen nach 24 Stunden unter bzw. sind gleich denen der Kontrollwerte. Dabei erreicht, mit der Ausnahme Fall IV, 3 mg% Vitamin-C höhere Indices als 1 mg% Vitamin-C. Nach 48 Stunden liegen bei allen vier Patientinnen die Mitose-Indices nach 3 mg% Vitamin-C höher als bei 1 mg% Vitamin-C und erreichen die Werte der Kontrollen.

In der Megalopoeose liegen die Werte von 3 mg% Vitamin-C wieder über denen von 1 mg% Vitamin-C und den Kontrollen sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden. Auffällig ist die individuelle Reaktion: Bei Fall I finden wir in beiden Ascorbinsäure-Konzentrationen die Mitose-Indices nach 48 Stunden unter den 24-Stunden-Werten, während sie bei Fall II nach 48 Stunden weiter gestiegen sind. Die Schwankungen können auf zu kleinen Zahlen beruhen.

In der normalen Erythropoeose entsprechen bei 1 mg% Vitamin-C nach 24 Stunden die Werte denen der Kontrollen. Nach 48 Stunden ließ sich nur bei Fall IV bei 1 mg% Vitamin-C ein Mitose-Index errechnen, der auch am Kontrollwert liegt. Bei 3 mg% Vitamin-C und 24 Stunden finden wir nur bei Fall III einen Mitose-Index, während nach 48 Stunden die Verhältnisse genau umgekehrt liegen.

Bei Zusammenfassung aller untersuchten Mitose-Indices ergeben sich keine deutlichen Veränderungen der gezählten Mitose-Indices durch Vitamin-C-Zusatz, jedoch liegen bei der Granulopoeose die Indices bei 1 mg% Vitamin-C etwas niedriger als bei 3 mg% Vitamin-C.

Tabelle E

Mitose-Indices (in Promille ausgedrückt) der

G r a n u l o p o e s e

	Original- ausstrich	Kontrolle 24 Std.	48 Std.	1 mg% Vit.C 24 Std.	48 Std.	3 mg% Vit.C 24 Std.	48 Std.
Fall I	8,5	28,0	10,9	13,3	8,0	17,4	11,2
Fall II	10,9	17,3	3,9	15,2	14,1	16,9	16,1
Fall III	16,2	15,7	16,2	10,8	12,7	15,1	16,3
Fall IV	11,8	15,9	10,7	15,2	9,2	11,9	12,5
Arithme- tisches Mittel	11,8	19,2	10,5	13,6	11,0	15,3	14,0

M e g a l o p o e s e

	Original- ausstrich	Kontrolle 24 Std.	48 Std.	1 mg% Vit.C 24 Std.	48 Std.	3 mg% Vit.C 24 Std.	48 Std.
Fall I	39,4	15,5	19,5	26,6	11,4	42,3	25,1
Fall II	30,8	35,5	5,2	21,9	27,4	33,2	47,6
Arithme- tisches Mittel	35,1	25,5	12,8	24,3	19,4	37,8	36,4

E r y t h r o p o e s e

	Original- ausstrich	Kontrolle 24 Std.	48 Std.	1 mg% Vit.C 24 Std.	48 Std.	3 mg% Vit.C 24 Std.	48 Std.
Fall III	19,3	20,0	75,0	21,7	0	20,4	0
Fall IV	15,5	21,7	14,9	21,8	13,5	0	40,5
Arithme- tisches Mittel	17,4	20,9	45,0	21,8	6,8	10,2	20,3

Aus den karyologischen Kurven (Abb. 17-18), der Mitosephasenverteilung von 240 gezählten Mitosen, ist folgendes zu erkennen:

(Wegen der kleinen Zahlen sind alle Zusatzkultur-Mitosen [in der Megalopoese 71, in der Granulopoese 69] zusammengefaßt. Die Einzeldarstellungen beider Konzentrationen ergaben keine wesentlichen Abweichungen voneinander [die Kontrollkulturen ergaben für die Megalopoese 44 und für die Granulopoese 56 Mitosen]. - Bei der zeichnerischen Darstellung wurden folgende Abkürzungen verwendet:

P = Prophase	A = Anaphase
FM = frühe Metaphase	T = Telophase
SM = späte Metaphase	R = Rekonstruktionsphase
—————	Kontrollkultur
- . - . - . -	Kultur mit Vitamin-C-Zusatz).

Die karyologische Kurve der Granulopoese ohne Vitamin-C beginnt mit 23,2 % Prophasen, steigt auf 39,3 % frühe Metaphasen und fällt über 21,4 % späte Metaphasen auf 8,9 Anaphasen. Telophasen und Rekonstruktionsphasen sind mit 3,6 % gleich stark vertreten.

Mit Vitamin-C-Zusatz liegen bei der karyologischen Kurve die Prophasen mit 33,3 % über dem entsprechenden Kontrollwert (23,2 %). Die frühen Metaphasen (39,1 %) erreichen die Kontrolle, während die späten Metaphasen (18,8 %) und die Anaphasen (4,3 %) ein wenig darunter liegen. Die Telophasen steigen mit 4,3 % noch einmal geringfügig an, während keine Rekonstruktionsphasen gefunden werden.

Vergleicht man die relative Häufigkeit der Prophasen in der

Granulopoese bei Kontroll- und Zusatzkulturen mit Hilfe des t-Testes, so läßt sich eine Signifikanz nicht sichern.

	Prophasen	Rest der Mitosen	
Mit Zusatz	23	46	69
Kontrollen	13	43	56
	36	89	125 = n

$v = n - 1 = 124$

$$t = \frac{|23 \times 43 - 13 \times 46|}{\sqrt{\frac{36 \times 89 \times 56 \times 69}{125}}} = \frac{9,9 - 6,0}{\sqrt{9,9}} = \frac{3,9}{3,14} = 1,24$$

$$t_{v, \alpha} = t_{124; 5 \%}$$

In der Megalopoese der Kontrollkulturen liegt der Beginn der karyologischen Kurve bei 45,4 % Prophasen und fällt über 18,1 % frühen Metaphasen, 13,6 % späten Metaphasen auf 9,1 % Anaphasen. Die Telophasen steigen mit 11,3 % noch einmal leicht an. Die Kurve endet mit 2,3 % Rekonstruktionsphasen.

In den Ascorbinsäure-Zusatzkulturen sind die Prophasen mit 50,7 % gegenüber den Kontrollen (45,4 %) geringfügig vermehrt. Bei allen späteren Mitose-Phasen ergaben sich keine nennenswerten Abweichungen von den Kontrollen. Die Anaphasen (5,6 %), Telophasen (8,4 %) und Rekonstruktionsphasen (1,4 %) liegen jeweils gering unter den entsprechenden Werten der Kontrollen. Die Mitosen der normalen Erythroblasten konnten nicht ausgewertet werden, da die Zahlen (30) zu gering waren.

In Zusammenfassung der karyologischen Kurven ergibt sich keine Hemmung in einer Mitose-Phase.

Abb. 17

- 52 -

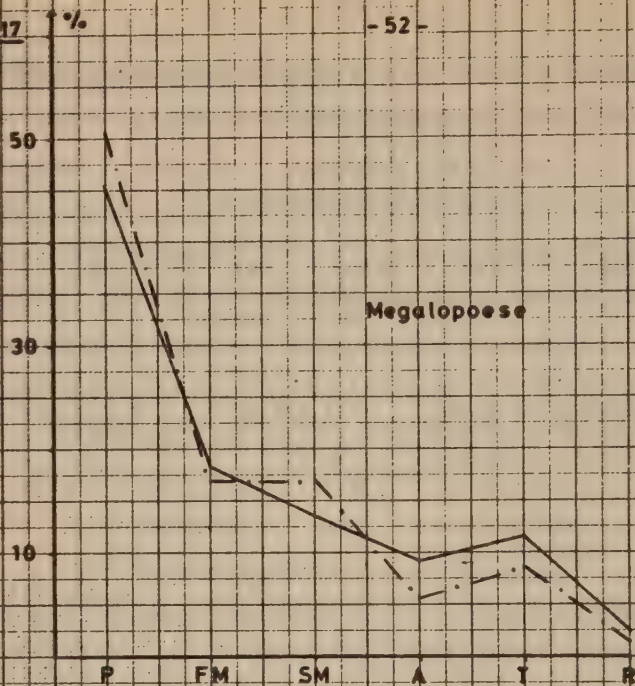
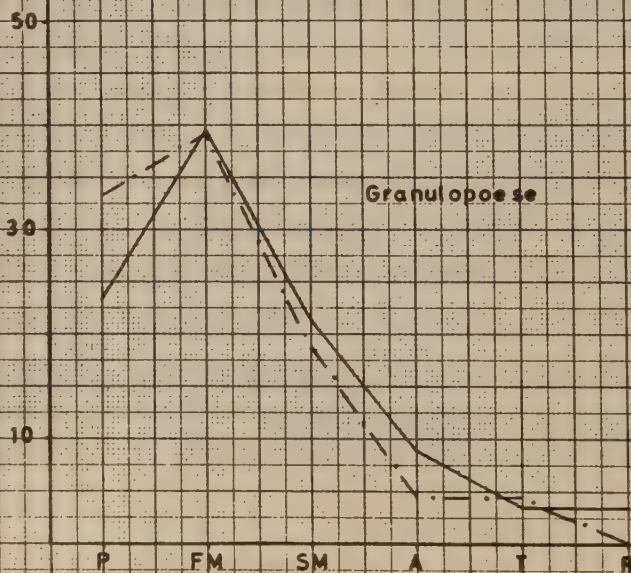


Abb. 18

+ %



Der G/E-Index der Originalausstriche entspricht den bekannten Verhältnissen der Megalopoese bzw. Normopoese. Beim G/E-Index in vitro liegen keine einheitlichen Veränderungen vor (Tab. F).

Tabelle F

G/E-Index

	Original- ausstrich	Kontrolle 24 Std.	48 Std.	1 mg% Vit.C 24 Std.	48 Std.	3 mg% Vit.C 24 Std.	48 Std.
Fall I	1,06	0,86	1,39	0,61	0,59	1,00	0,56
Fall II	1,10	1,24	2,25	0,88	1,70	0,88	4,18
Fall III	3,10	1,83	5,79	2,07	2,79	2,68	3,00
Fall IV	4,30	1,20	2,40	1,00	1,37	1,03	3,18

Die Verminderung der reifen Megaloblasten in den Kontrollen nach 48 Stunden (Fall I und II) ist eine scheinbare, da der G/E-Index gleichzeitig deutlich erhöht wird. Diese Veränderung der Verhältniszahl findet sich nach Vitamin-C-Zusatz kaum.

D i s k u s s i o n

Untersuchungen über die Einwirkungen von Vitamin-C auf das menschliche Knochenmark sind uns weder in vivo noch in vitro bekannt. In der Literatur wird nur die Vermehrung der Leukozyten im peripheren Blut (NEANDER (48), MÜLLER (47), GRAB (23), CARRIE (12), JUSIPOV (31), STEPP (63)) durch Vitamin-C-Gabe beschrieben. Deswegen wurde immer wieder eine Vitamin-C-Behandlung bei leukopenischem Blutbild durchgeführt.

Nach GRAB (23) gibt es wahrscheinlich nur wenige echte "pharmakodynamische Wirkungen" der Ascorbinsäure, also Effekte, die abhängig von der zugesetzten Dosis sind. Davon ist selbstverständlich die "substitutive Wirkung" bei Mangelzuständen abzutrennen. Ob es sich in unserer Versuchsanordnung der Knochenmark-Kulturen um pharmakodynamische Wirkungen handelt, können wir nicht mit Sicherheit sagen, da die Vitamin-C-Sättigung des Blutes der Patientinnen und somit auch des Knochenmarkes unbekannt war. Bei der derzeitigen Ernährungslage und gesunden Personen liegt im August - der Jahreszeit der Untersuchungen - der Vitamin-C-Spiegel im Durchschnitt bei 0,8 mg% (63), bei Kranken ist er niedriger anzusetzen. Deswegen ist schon 1 mg% Vitamin-C vermutungsweise eine leichte Vermehrung gegen die Ausgangswerte der Kulturen ohne Vitamin-C-Zusatz. 3 mg% Vitamin-C ist die in vivo höchst erreichbare Dosis.

Betrachten wir die direkte Beeinflussung der Granulopoese während zweier Tage in vitro, so finden wir durch 3 mg% Vitamin-C-Zusatz keine eindeutigen Effekte. Vielleicht wirkt

diese in vivo nur durch höchste Dosen erreichbare Konzentration durch die Abbauprodukte der Ascorbinsäure in vitro etwas toxisch, wenngleich sich morphologisch keine Degenerationserscheinungen an den Zellen abzeichnen und der Mitose-Index bei der Megalopoese erhöht ist.

Die Dosis von 1 mg% Vitamin-C fördert die Ausreifung der Granulopoese: Die Reifungskurve der Granulopoese ohne Vitamin-C-Zusatz hat bei den beiden Fällen des Megaloblastenmarkes, aber auch bei den beiden anderen Fällen, einen ähnlichen Verlauf wie die Reifungskurve der Megalogranulopoese bei BOLL ⁽⁸⁾ (Abb. 19). Durch 1mg% Vitamin-C-Zusatz werden unsere Reifungskurven denen der "normalen Granulopoese" bei BOLL ⁽⁸⁾ angeglichen (Abb. 20). BOLL ⁽⁸⁾ führt die Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten nach 24 Stunden in vitro auf eine Stimulierung der Regeneration durch die Kulturbedingungen und auf die kurze Lebensdauer der Segmentkernigen zurück. Nach 48 - 72 Stunden in vitro überwiege die Reifung der Regeneration, und die ausgereiften Zellen nähmen bei Rückgang der Mitose-Indices wieder zu. Die anfängliche Regenerations-Stimulierung und die Reifung wäre bei der Megalogranulopoese beeinträchtigt. Die Annäherung des Kurventyps der Megalogranulopoese (Abb. 3 und 7) an den der normalen Granulopoese (Abb. 20) durch den Vitamin-C-Zusatz von 1 mg% entspricht deswegen einer Reifungszunahme. Auch die Regeneration müßte zugenommen haben, ist aber nach dem Mitose-Index etwas eingeschränkt, wenn hier nicht zu kleine Zahlen die Ursache der Verminderung sind.

Abb. 20 MB P NM EM J St NS ES 100% -56-

24

48

72

Std.

Normale -
Granulopese
(11 Fälle)

Abb. 19 MB P NM EM J St NS ES 100%

24

48

72

Std.

Megalo -
Granulopese
(7 Fälle)

Eine Mitose-Arretierung ließ sich durch die Zusammenstellung in der karyologischen Kurve, die sowohl bei den Granuloblasten als auch bei den Megaloblasten denen der von BOLL (8) ähnelt, ausschließen. Eine Prophasenvermehrung, wie wir sie bei den Granuloblasten sehen, deutet nach BEGEMANN und HEMMERLE (5) auf eine Regenerationsvermehrung hin und kann bei den erniedrigten Mitose-Indices unserer Fälle nur auf die fehlende Signifikanz zurückgeführt werden.

Unter Zusatz von 1 mg% Ascorbinsäure überwiegt die Reifungsförderung die Regeneration der Granulopoese. Ob es sich aber bei der Verschiebung zugunsten der segmentkernigen Zellen nach 48 Stunden um eine echte Reifungsbeschleunigung handelt, läßt sich aus unserer Versuchsanordnung nicht sicher entscheiden. Das Fehlen einer gleichzeitigen Regenerationsvermehrung (erhöhter Mitose-Index) spricht eher dagegen. Es könnte sich bei der relativen Zunahme auch um eine Stabilisierung der ausgereiften Neutrophilen handeln, also um eine Verlängerung ihrer Lebensdauer. Das würde aber nur die unter Ascorbinsäure entstandenen Granulozyten betreffen, denn die in die Kultur mit eingebrachten segmentkernigen Granulozyten sind nach 24 Stunden in 3 der beobachteten Fälle stärker unter Vitamin-C vermindert als in den Kontrollen.

In der normalen Erythropoese spiegeln sich ähnliche Veränderungen der Proliferationsaktivität durch 1 mg% Vitamin-C wider: Die Reifung, die schon in den Kontrollen vorhanden ist, wird weiter gefördert, ohne daß eine Regenerationsvermehrung stattfindet. Die Vermehrung der reifen Erythroblasten kann allerdings auch durch eine Behinderung der Entker-

nung hervorgerufen werden, wofür der fehlende Anstieg des G/E-Index' unter Vitamin-C-Zusatz spricht. Dem gleichzusetzen ist die Retikulozytenvermehrung im peripheren Blut nach Beobachtungen von SEYDERHELM und GREBE (61), GAUBATZ und DEBOBEN (19) sowie EULER und MALMBERG (17) und der von STANGL (62) beschriebenen Reifungsförderung. 3 mg% Vitamin-C zeigen keine eindeutigen Veränderungen.

Im Gegensatz zu der reifungsfördernden Wirkung von 1 mg% Vitamin-C auf die Granulopoese und normale Erythropoese steht die Wirkung der Ascorbinsäure auf die Megalopoese. Die nach 24 Stunden in den Kontrollkulturen beider Fälle ausgeprägte Zunahme der reifen Megaloblasten, findet unter beiden Konzentrationen von Vitamin-C nicht statt. Eine mögliche Reifungsbeschleunigung bis zu Erythrozyten, die bei unserer Versuchsanordnung unbemerkt bliebe, scheint nach dem Verhältnis der roten zur weißen Reihe, dem G/E-Index, nicht vorzuliegen. Nach 48 Stunden haben in den Kontrollkulturen die teilungsfähigen Megaloblasten wieder zugenommen, entweder infolge ihrer hohen Regenerationsleistung (der Mitose-Index bleibt etwa auf den Ausgangswerten, damit sehr hoch) oder infolge Abnahme der reifen Megaloblasten durch Entkernung, wodurch die reifen Megaloblasten relativ vermindert werden und der G/E-Index, wie beobachtet, ansteigt. Die erneute Verschiebung zugunsten der unreifen Formen nach 48 Stunden findet unter Vitamin-C nicht statt, obgleich der Mitose-Index eher erhöht ist. In dem in Kultur gesetzten Megaloblastenmark finden sich 70 % basophile Megaloblasten, von denen offensichtlich ein großer Anteil nach 24 Stunden

zu "reifen" Zellen mit pyknotischen Kernen ausgereift ist, der sich nach weiteren 24 Stunden entkernt haben dürfte (BOLL ⁽⁹⁾). Außerdem werden nach THEUNER ⁽⁷¹⁾ die meisten Megaloblasten in vitro durch den Vitamin-B₁₂-Gehalt des Wuchsstoffes Embryonalextrakt zu Übergangsformen bzw. normalen Erythroblasten entwickelt, was durch weiteren Zusatz von Vitamin-B₁₂ nicht gesteigert werden kann. Diese Umwandlung wurde in unseren Kulturen, die als Wuchsstoff Corhormon enthielten, kaum beobachtet. Sowieso findet sich in jedem Megaloblastenmark ein gewisser schwankender Anteil normaler Erythroblasten, der also in vitro unter Corhormon-Zusatz weniger zunimmt als unter Zusatz von Hühnerembryonalextrakt. Wir haben uns mit der Differenzierung der Umwandlung von Megalozu Erythroblasten nicht auseinandergesetzt, und beide Formen zusammen nur nach ihrer Reifungsstufe, d.h. Hämoglobinbeladung und Kerndichte beurteilt. Ein auffälliger Unterschied zwischen den Kontrollkulturen und den Ascorbinsäure-Kulturen bzgl. der Umwandlung der Megaloblasten, ließ sich jedoch nicht feststellen.

Ob die Reifungshemmung der Megaloblasten in vitro durch Vitamin-C ein Korrelat in vivo hat, muß vorerst dahingestellt bleiben, da wir keine diesbezüglichen Untersuchungen in der Literatur gefunden haben. Die megaloblastische Umwandlung beim Skorbut (JENNINGS und GLAZERBROOK ⁽³⁰⁾, STUDER, ZBINDEN und MEHLINGER ⁽⁶⁶⁾ und VILTER, WAOLFORD und SPIES ⁽⁷³⁾) und der kindlichen Megaloblasten-Anämie (MAY und Mitarb. ^(42,43) und KELLER und WISKOTT ⁽³³⁾ u.a.) wird nach DOCTOR ⁽¹⁵⁾ durch den mangelnden Schutz einer Vorstufe des Citrovorum-

factors hervorgerufen. Die in vivo-Versuche von MAY, HAMIL' TON, STEWART ⁽⁴¹⁾ und SUNDBERG, SCHAAR, MAY ⁽⁶⁷⁾ bei denen das megaloblastische Knochenmark skorbutischer Affen durch Vitamin-C zum normoblastischen umgebildet wird, können nicht gegen unsere Ergebnisse sprechen, da unserem Megaloblastenmark ein sicherer B₁₂-Mangel zugrunde liegt und der limitierende Faktor sicher nicht das Vitamin-C ist. Eine Megaloblasten-Umwandlung zu Normoblasten unter Vitamin-C ist daher nicht zu erwarten. Ob die Verzögerung der Megaloblasten-Ausreifung durch Vitamin-C in vitro klinisch ins Gewicht fallen kann, bleibt dahingestellt.

Interessant jedoch ist, daß die Reifungsförderung des Vitamin-C in der nicht maximalen Dosis die Granulopoese und die normale Erythropoese, aber nicht die Megalopoese betrifft. Da die Proliferation die Reifung und Regeneration umfaßt, kann man aufgrund der fehlenden Regenerationssteigerung (Mitose-Index) auch für die normale Myelopoese nicht von einer Proliferationsanregung in vitro sprechen, wie sie SCHOEN ⁽⁵⁹⁾ für die Östrogene feststellen konnte. Es handelt sich lediglich um eine reine Reifungsförderung auf die Normopoese durch 1 mg% Vitamin-C, wobei eine Stabilisierung der reifen Granulozyten bzw. der Verlängerung ihrer Lebensdauer neben einer Entkernungsverzögerung in der normalen Erythropoese ein wesentlicher Bestandteil der Wirkung sein kann.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Da Vitamin-C klinisch zur Erhöhung der Leukozytenzahl verwendet wird, sollte die direkte Einwirkung von 2 im physiologischen Bereich liegenden Konzentrationen auf die Hämatopoese in der Knochenmarkkultur geprüft werden.

Nach Differential-Zählungen bis zu 72 Stunden in vitro wurden Reifungs- und karyologische Kurven aufgestellt, sowie der Mitose- und der G/E-Index bestimmt. Die Auswertung ergibt eine Reifungsförderung der Granulopoese und normalen Erythropoese ohne Erhöhung der Regeneration nach 1 mg% Vitamin-C. Eine Verlängerung der Lebensdauer der ausgereiften Granulozyten durch Vitamin-C läßt sich dabei als Ursache der Versuchsergebnisse nicht ausschließen. Weil die Regeneration nicht gesteigert ist, kann man nicht von einer Proliferationsförderung sprechen. Im Gegensatz dazu wurde die Megalopoese durch beide Konzentrationen von Vitamin-C in der Reifung gehemmt, die Regeneration dagegen gefördert.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. ALBRECHT, M. u. I. BOLL : "Untersuchungen über die Einwirkungen von Colchicin, arseniger Säure, Stickstofflost und Aethylurethan auf menschliches Knochenmark in vitro"
Ärztl. Wschr. 5, 27, 485 (1950)
2. ANSTETT, F. : "Therapeutische Erfahrungen von Vitamin C (l-Ascorbinsäure) bei Skorbut und bei essentieller Thrombopenie (Morbus maculosus Werlhofii)"
Z. exper. Med. 97, 214 (1936)
3. BARBIER, H. : "Vitamin C und Blut unter besonderer Berücksichtigung der Reticulosyten und des weißen Blutbildes"
Klin. Wschr. 928 (1938)
4. BARTLEY, W., H.A. KREBS, I.R.P. O'BRIEN :
"Vitamin C requirement of human adults"
Spec. Rep. Ser. med. Res. Council. (London)
Nr. 280 40 (1953)
5. BEGEMANN, H. u. W. HEMMERLE : "Die Mitose-tätigkeit des menschlichen Knochenmark und ihre Beeinflussung durch cytostatische Substanz"
Klin. Wschr. 27, 530 (1949)
6. BÖGER, A. u. W. MARTIN : "Vitamin C und Blut"
Münch. med. Wschr. I 899 (1935)
7. BOLL, I. : "Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkszellen in vitro -Granuloblastenmitose-"
Fol. haematol. neue Folge 3, 1, 58 (1958)
8. BOLL, I. : "Granulocytopoese unter normalen und pathologischen Bedingungen"
Springer-Verlag 1966
9. BOLL, I. u. G. FUCHS : "Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro"
Blut VII, 257 (1961)

10. BORSOOK, DAVENPORT, JEFFREYS u. WARNER :
"The Oxidation of Ascorbic Acid and its Reduction in vitro and vivo"
J. Biol. Chem. 117, 237 (1937)
11. BÜRGER, M. : "Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten"
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S.425 (1951)
12. CARRIE, C. : "Zur Behebung der Röntgenstrahlenleukopenie"
Klin. Wschr. 163 (1938)
13. CHRISTINE, L., G. THOMSON, B. IGGO, A.C. BROWNIE,
C.A. STEWARD : "The Reduction of Dehydroascorbic
Acid by Human Erythrocytes"
Clin. Chim. Acta 1, 357 (1956)
14. DEGKWITZ, E., W. SCHNEIDER, H.J. STAUDINGER :
"Biochemie der Ascorbinsäure"
in Wissenschaftliche Veröffentlichungen der
Deutschen Gesellschaft für Ernährung, Band 14
"Ascorbinsäure"
Dr.Dietrich Steinkopf-Verlag Darmstadt (1965)
15. DOCTOR, V.M. : "Studies in Vivo on the Conversion of
Folic Acid to Citrovorum Factor"
J. biol. Chem. 233, 982 (1958)
16. EEKELEN, M. van, A. EMMERIE, B. JOSEPHY, L.K. WOLFF :
"Vitamin C in Blood and Urin?"
Nature 132, 315 (1953)
17. EULER, H.v. u. M. MALMBERG : "Einfluß der Eingaben von
Askorbinsäure und Vitamin P (Citrin) auf den
Gehalt des Meerschweinchenblutes an vitalfärb-
baren Erythrocyten"
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische
Chemie 249, 85 (1937)
ders. "Einfluß der Eingaben von Askorbinsäure und
Citrin auf den Gehalt des Meerschweinchenblutes
an vitalfärbbaren Erythrocyten II "
252, 24 (1938)

- ders. "Einfluß der Eingaben von Ascorbinsäure und Citrin auf den Gehalt des Meerschweinchenblutes an vitalfärbbaren Erythrozyten III"
256, 243 (1938)
- ders. "Blutzellenbestand und Ascorbinsäuregehalt bei Meerschweinchen"
243, 121 (1936)
18. GABBE, E. : "Bestimmung von Vitamin C im Blutserum"
Klin. Wschr. 39, 1389 (1934)
19. GAUBATZ, E. u. W. DEBOEN : "Retikulozytenforschung und Behandlung der Toxischen Durchfälle bei Tuberkulose"
Klin. Wschr. 1148 (1937)
20. GLEJZER, G.I. : "Die Ascorbinsäure in Blut und Knochenmark bei Ulcusleiden nach Magenresektion und ihr Einfluß auf die Blutbildung"
Vračebnoe delo, Kiev, 1957, Suppl. S. 6
Nach einem Referat von Müller-Dietz, Osteuropainstitut der Freien Universität Berlin
21. GOLDEN, R. and F. SARGENT : "The Passage Of Ascorbic Acid Across The Membran Of The Human Erythrocyt"
Archives of Biochemistry and Biophysics 39 (1), 138, (1952)
22. GOLDMANN, H., W. BUSCHKE : "Ascorbinsäure (C-Vitamin) und Blutkammerwasserschranke"
Klin. Wschr. 7, 239 (1935)
23. GRAB, W. : "Pharmakodynamische Wirkungen der Ascorbinsäure"
in Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Dt. Gesellschaft für Ernährung, Band 14 "Ascorbinsäure"
24. GRAFE, E. : "Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten und ihre Behandlung"
Springer-Verlag (1958) - 2. wesentlich ergänzte und erweiterte Auflage - S. 114

25. HARMANN u. KORDISCH : zitiert nach Handbuch der Allgemeinen Pathologie
s. STUDER, ZBINDEN u. MEHLINGER - Nr. 66 -
26. HEILMEYER u. H. BEGEMANN : "7. Avitaminotische Anämien"
In Handbuch der Inneren Medizin II, 433
Springer Verlag (1954)
27. HEINEMANN, M. : "Influences of Erythrocytes and of Leucocytes on Stability and Transfer of Ascorbic Acid in Human Blood"
J. Clin. Invest. 20, 467 (1941)
28. HENDRY, J.M., L.H. EASON, J.A. OVEN :
"The uptake and reduction of dehydroascorbic acid by human leucocytes"
Clin. Chim. Acta 9, 498 (1964)
29. HOFMEIER, K. : "Über die Auswirkung langfristiger Vitamin-C-Gaben auf anfällige Kinder und solchen mit lymphatischer Diathese"
Med. 48, 2351 (1959)
30. JENNINGS, G.H., A.J. GLAZERBROOJ : "A Comparison Of Clinical And Blood Pictures In Adult Scurvy"
Brit. Med. J. (London) 784-9 (1938 II)
31. JUSIPOV, V.S. : "Die Bedeutung der Ascorbinsäure bei Strahlenkrankheit"
Med. Radiol. (Mosk.) 9, 79 (1959)
Nach einem Referat von Müller-Dietz, Osteuropa-Institut der Freien Universität Berlin
32. KELLER : "Beeinflussung des Hypophysen-Nebennierenrindensystems durch Vitamin C"
Klin. Wschr. 668 (1952)
33. KELLER, W. und A. WISKOTT :
Lehrbuch der Kinderheilkunde, 278
Georg Thieme Verlag (1961)
34. KELLIE, A.E. u. S.S. ZILVA : "The Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid"
Biochem. J. 1028 (1935 I)

35. KERSTEN, H., S. LEONHÄUSER, A.J. STAUDINGER :
"Zum Wirkungsmechanismus der Ascorbinsäure"
Biochim. biophys. Acta 29, 350 (1958)
36. KÜHNAU, J. u. L.v. HOLT : "Die Vitamine (theoretischer
und experimentieller Teil)"
in Klinik der Gegenwart, Band 7, 175
Urban u. Schwarzenberg, München-Berlin (1958)
37. LEIBETSEDER, F. : "Vitamin C und Hämatopoese"
Med. Klin. 1605 (1959)
38. LLOYD, B.B. : "The distubution of ascorbic and dehydro-
ascorbic acid in blood"
J. Physiol. (London) 112, 49 P. (1951)
39. LLOYD, B.B. u. H.M. SINCLAIR : "Vitamin C"
in G.H. Bourne und G.W. Kidder
Biochemistry and Physiology of Nutrition
Vol. I. N.Y. 1953 P. 387
40. MARTIN, G.R. : "Studies On The Tissue Distribution Of
Ascorbic Acid"
Ann. N.Y. Acad. Sci. 92, 141 (1961)
41. MAY, C.D., A. HAMILTON, C.T. STEWART : "Experimental
Megaloblastic Anaemia and Scurvy in the Monkey"
Blood 7, 978 (1952)
42. MAY, C.D., E.N. NELSON, C.U. LOWE, R.J. SALMON :
"Pathogenesis Of Megaloblastic Anemia In
Infancy"
Amer. J. Dis. Child. 80, 191 (1950)
43. MAY, C.D., R.D. SUNDBERG, F. SCHAAR, C.U. LOWE,
R.J. SALMON :
Experimental Nutritional Megaloblastic Anemia
Relation of A.A. and Pteroylglutamic Acid
Amer. J. Dis. Child 82, 282 (1951)
44. McMILLAN, R.B., J.C. INGLIS : Scurvy: A Survey of
Fifty-Threes Cases"
Brit. Med. J. 2, 233 (1944)

45. METTIER, S.R., G.R. MINOT, W.C. TOWNSEND :
"Scurvy in adults"
J. Amer. Med. Assoc. 95, 1089 (1930)
46. MEYER u. McCORMICK : zitiert nach Handbuch der Allgemeinen Pathologie
s. STUDER, ZBINDEN u. MEHLINGER - Nr. 66 -
47. MÜLLER, A.H. : "Über die Beziehungen zwischen einigen Vitaminen und der Zellzusammensetzung des Blutes"
Z. f. d. ges. Inn. Med. 284 (1947)
48. NEANDER, G. : "The Effect of Vitamin C on the number of granulocytes in the blood"
Acta Med. Scand. 109, 453 (1942)
49. PAPAYANOPULOS, G. u. H. SCHROEDER : "Über das Verhalten der Thrombozyten nach großer Vitamin-C-Menge"
Klin. Wschr. 18, 428 (1939)
50. PARSONS und SMALLWOOD
Arch. Dis. Child. 10, 327 (1935)
zitiert nach STEPP, KÜHNAU, SCHROEDER -Nr. 63-
51. PATTERSON, J.W., D.W. MOSTIN : "Effect of Dehydroascorbic Acid on Central Nervous System"
Amer. J. Physiol. 167, 119 (1951)
52. PILIERO, S.J. u. A.S. GORDON : "The Relation of Ascorbic Acid and the Adrenal to Blood Formation"
Acta Haemat. 11, 114 (1954)
53. PLAUT, F. und M. BÜLOW : "Vergleichende Untersuchungen über den C-Vitamin (Ascorbinsäure-) Gehalt im Blut und im Liquor cerebrospinalis"
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 236, 241 (1935)
54. PROEHL, E.C., C.D. MAY : "Experimental Nutritional Megaloblastic Anemia and Scurvey in the Monkey"
Blood 7, 671 (1952)

55. SCHADE, H.A. : "Beitrag zur Frage des Einflusses von Vitamin C (l-Askorbinsäure) auf Pigmentierungsvorgänge"
Klin. Wschr. I, 60 (1935)
56. SCHNEIDER, W., H.J. STAUDINGER : "Zum Wirkungsmechanismus von Vitamin C"
Sonderdruck aus Klin. Wschr. 18,879 (1964)
57. SCHNETZ, H. : "Vitamin C und Leukozytenzahl"
Klin. Wschr. 267 (1938)
58. SCHNETZ, H. und St. GREIF : "Die Leukopenie bei Grippe im Sternalmark"
Z. klin. Med. 128 (1937)
59. SCHOEN, S. (geb. Hamann) : "Proliferationsanregung der Granulopoese in vitro durch Östrogen"
Inaugural Dissertation, Berlin (1966)
60. SCHULTZE, M.O., E. STOTZ, C.G. KING : "Studies of the Reduction of Dehydroascorbic Acid by Guinea Pig Tissues"
J. Biol. Chem. 122, 407 (1937-38)
61. SEYDERHELM und GREBE : zitiert nach A.H. MÜLLER -Nr.47-
62. STANGL, E. : "Vitamine"
im Handbuch der gesamten Hämatologie, Band 3,
I. Teil, 132
herausgegeben von L. Heilmeyer u. A. Hittmaier
Urban und Schwarzenberg, München (1960)
63. STEPP, W., J. KÜHNAU, H. SCHROEDER : "Die Vitamine und ihre klinische Anwendung"
7. umgearbeitete und erweiterte Auflage, Band 2
(1957) S. 598-665 , Ferdinand Enke Verlag
64. STEWART, C.P., D.B. HORN, J.S. ROBSON : "The Effect of Cortisone and Adrenocortico Aropic Hormone on the Dehydroascorbic Acid of Human Plasma"
Biochem. J. 53, 254 (1953)

65. STUDER, A. : "Vitamine und andere Wirkstoffe"
in Handbuch der gesamten Hämatologie
herausgegeben von L. Heilmeyer u. A. Hittmaier
2. Band, 1. Halbband
Urban Schwarzenberg, München-Berlin (1959)
66. STUDER, A., G. ZBINDEN, E. MEHLINGER :
"Die Pathologie der Avitaminosen und Hypervitaminosen"
Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Band 11,
Teil 1, Springer-Verlag (1962)
67. SUNDBERG, R.D., F. SCHAAR, C.D. MAY : "Experimental
Nutritional Megaloblastic Anemia , II. Hematology"
Blood 7, 1143 (1952)
68. SUZUKI und MATSUMOTO
Chiryo oyobi shoko (1936) 17. K. zitiert nach
Zoltan Aszodi
Klin. Wschr. 20, 715 (1937)
69. SZENT-GYÖRGYI, A. und W.N. HAWORTH
Nature (London) 131, 24 (1933) zitiert nach wissenschaftliche Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, Band 14, "Ascorbinsäure" (1964)
Dr.Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt (1965)
70. THEDERING, F. u. R. BECK : "Störungen der Eisenverdauung
und Eisenresorption als Pathologische Faktoren
der Essentiellen Hypochromen Anämie"
Klin. Wschr. 31, 127 (1953)
71. THEUNER, E. : "Untersuchungen über die Wirkung von
Vitamin B₁₂ auf Megaloblasten und von Perniciosaserum auf Normoblasten in Vitro"
Inaugural-Dissertation, Berlin (1957)

72. VANHA-PERTTULA, T.P.J. : "Effect of Vitamine C on
Circulating Eosinophilic Cells"
Ann. Med. Exp. Fenn. 40, 67 (1962)
73. VILTER, R.W., E.M. WAOLFORD, T.D. SPIES :
"Severe scurvy, a clinical and hematological
study"
J. Labor a Clin. Med. 31, 609 (1946)
zitiert nach H. Zellweger, W.A. Adolph :
"Vitamine und Vitaminkrankheiten"
Handbuch der Inneren Medizin, 4. Auflage,
Band VI/2, Springer-Verlag (1954)
74. VITAMIN VADEMECUM "Roche" 3. Auflage (1965)
Deutsche Hoffmann - La-Roche AG.
75. ZELLWEGE, H., W.A. ADOLPH: "Vitamine und Vitaminkrank-
heiten"
Handbuch der Inneren Medizin, 4. Auflage,
Band VI/2, Springer-Verlag (1954)
76. ZÖLLNER, N. : "Feststellung von Ascorbinsäure -
Mangelzuständen"
in Wissenschaftliche Veröffentlichungen der
Deutschen Gesellschaft für Ernährung, Band 14,
"Ascorbinsäure"
77. Wissenschaftliche Tabellen
J.R. Geigy, Basel (1955)

Am Schluß dieser Arbeit sei es mir erlaubt, Frau Privat-Dozentin Dr. med. I. Boll für die Anregung zur Bearbeitung des Themas, für die Unterstützung und die wertvollen Hinweise sowie für das stetige Interesse am Fortgang der Untersuchungen zu danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. rer. nat. G. Fuchs für die Anleitung zur Durchführung der Signifikanzberechnung und Herrn Professor Dr. med. K. Holldack für die mir in seinem Hause zuteil gewordene freundliche Hilfe.

L e b e n s l a u f

Am 29. Dezember 1940 wurde ich in Berlin als Sohn des Textil-Handelsvertreters Werner Schmidt und seiner Ehefrau Magdalene, geb. Bringer, geboren. Mein Vater nahm als Polizeireservist an den Kämpfen um Berlin teil und ist seit 1945 vermißt. Durch die Evakuierung nach Nienburg/Saale, besuchte ich dort 6 1/2 Jahre die Grundschule. 1954 nach Berlin zurückgekehrt, bestand ich an der Paulsen-Schule die Reifeprüfung (1961).

Seit dem Sommer-Semester 1961 studierte ich an der Freien Universität Berlin Human-Medizin, mit Ausnahme des Winter-Semesters 1963/1964 an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg. An der Freien Universität Berlin bestand ich im Frühjahr 1962 das Vorphysikum und im Oktober 1963 das Physikum. Hier beendete ich im März 1967 das Medizinische Staatsexamen.

